

**Einfluss des Fluorchinolons Moxifloxacin auf
parodontopathogene Mikroorganismen und die Freisetzung von
Zytokinen im Zusammenhang mit KB-Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Stefanie Schwarz
geboren am 21.04.1980 in Erfurt

Gutachter:

1. PD Dr. S. Eick, Jena
2. Prof. Dr. Dr. L. Stößer, Jena
3. Prof. Dr. H. Jentsch, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.03.2006

Abkürzungsverzeichnis

A.a. / A. actinomycetemcomitans	Actinobacillus actinomycetemcomitans
A. naeslundii	Actinomyces naeslundii
ATCC	American type culture collection
Aqua dest.	bidestilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay
EMEM	eagle minimum essential medium
FKS	fetales Kälberserum
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharid
MHK	minimale Hemmkonzentration
PBS	phosphate buffered saline
P.g. / P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
P. intermedia	Prevotella intermedia
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
T. denticola	Treponema denticola
T. forsythia	Tannerella forsythia (alt: Bacteroides forsythus)
TGF	Transforming-Growth-Factor
TNF	Tumornekrosefaktor

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Definition und Klassifikation der Parodontitis	3
2.2. Pathogenese der Parodontitis	4
2.3. Actinobacillus actinomycetemcomitans und Porphyromonas gingivalis - bedeutend bei Manifestation und Progredienz der Parodontitis	5
2.4. Die Schlüsselfunktion der Zytokine bei der parodontalen Erkrankung	9
2.5. Therapie der Parodontitis unter möglicher Berücksichtigung des Fluorchinolons Moxifloxacin	14
3. Zielstellung	18
4. Material und Methoden	19
4.1. Anzucht der Zellen	19
4.2. Bakterienstämme	20
4.3. Antibiotika	21
4.4. Versuchsansatz III - Gleichzeitige Zugabe des Antibiotikums und des Bakterienstammes zu den KB-Zellen	22
4.5. Bestimmung der Zahl der freien, adhärenenten und internalisierten Bakterien sowie Entnahme von Zellkulturüberständen	24
4.6. Nachweis der Zytokine	26
4.7. Versuchsansatz I - Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin	27
4.8. Versuchsansatz II - Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin	29
5. Ergebnisse	31
5.1. Freie Bakterien	31
5.2. Adhärenente Bakterien	33
5.3. Invasive Bakterien	35
5.4. Freisetzung der Zytokine	38

6. Diskussion	46
6.1. Methodik	46
6.2. Adhärenz und Invasion	48
6.3. Freisetzung der Zytokine	51
7. Schlussfolgerungen	57
8. Literaturverzeichnis	58
9. Anhang	69
10. Danksagung	74
11. Lebenslauf	75
12. Ehrenwörtliche Erklärung	76

1. Zusammenfassung

Das Vorhandensein der pathogenen Mikroorganismen *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* spielt eine entscheidende Rolle bei der Manifestation und Progression parodontaler Erkrankungen. Beide Spezies sind in der Lage, an Epithelzellen zu adhären und in diese zu penetrieren. *P. gingivalis* verfügt zudem über die Fähigkeit der intrazellulären Persistenz. Die Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* scheint eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Interleukine aus den Epithelzellen zu induzieren. *P. gingivalis* hingegen ist dafür bekannt, die vom Wirtsorganismus sezernierten Zytokine abbauen zu können. Sowohl *A. actinomycetemcomitans* als auch *P. gingivalis* modulieren somit die Immunantwort und haben eine Schlüsselfunktion beim Fortbestehen einer Parodontitis. In der Therapie dieser Erkrankung stellt die adjuvante Applikation eines Antibiotikums heute einen etablierten Bestandteil dar.

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses des Fluorchinolons Moxifloxacin auf die Adhärenz und Invasion der Stämme *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277. Zudem sollte die Freisetzung der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und TGF- β 1 aus den mit parodontopathogenen Mikroorganismen und Moxifloxacin inkubierten Epithelzellen mittels ELISA-Test detektiert werden.

Die Durchführung der Versuche erfolgte an KB-Zellen, die einem oralen Epidermoidkarzinom entstammen und eine permanente Zelllinie darstellen. In Abhängigkeit des gewählten Versuchsansatzes wurden entweder die KB-Zellen (Ansatz I) oder der zu untersuchende Bakterienstamm (Ansatz II) für 1 h mit verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen vorinkubiert. In Versuchsansatz III erfolgte die zeitgleiche Zugabe der Mikroorganismen und des Antibiotikums zu den Zellen. Inkubationszeiten bis 18 h schlossen sich an. Zur Bestimmung der frei vorkommenden Bakterien wurden danach die Überstände aus den Gewebekulturplatten entnommen und auf Agarplatten ausgestrichen. Zudem folgte die Gewinnung der Proben, die später mittels ELISA-Technik auf das Vorhandensein von Zytokinen untersucht wurden. Abschließend wurden die Proben für die Ermittlung der Zahlen der adhärenen Mikroorganismen und nach Zugabe von Metronidazol und Zelllyse die der invasiven Bakterien gewonnen.

Moxifloxacin erwies sich als hoch effizient gegenüber den von uns untersuchten Bakterienstämmen. So ist es bei gleichzeitiger Zugabe des Antibiotikums und der Mikroorganismen zu den Zellen innerhalb von 18 h gelungen, die adhären, internalisierten und freien *A. actinomycetemcomitans* mit Konzentrationen von 2,5 µg/ml bzw. 100 µg/ml Moxifloxacin um mehr als 99% zu minimieren bzw. sie sogar vollständig zu eliminieren. Bereits Antibiotikumkanzenzen von 1/4 MHK reduzierten die Erregerzahlen nach 18 h auf 1,6%. Auch die Werte freier und adhärenter *P. gingivalis* sanken nach 18 h bereits bei den niedrigeren Antibiotikumkanzenzen deutlich, bei 100 µg/ml Moxifloxacin betrug die Keimreduktion mehr als 99%. Die internalisierten Mikroorganismen wurden bei dieser Konzentration innerhalb der Inkubationszeit vollständig abgetötet.

Eine Freisetzung der Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α aus den KB-Zellen konnte, unabhängig vom Versuchsansatz, innerhalb der 18 h Inkubationszeit weder nach Infektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 noch mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 festgestellt werden. Die IL-8-Sezernierung der mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierten Zellen hingegen war, genau wie bei den nicht infizierten Zellen, bei allen Versuchsansätzen in Abhängigkeit des Untersuchungszeitraums und der zugegebenen Moxifloxacinkonzentrationen bis auf das 16 fache erhöht. *P. gingivalis* ATCC 33277 aber ist offensichtlich auch unter Zugabe von Moxifloxacin in der Lage, IL-8 abzubauen. Zu keinem Zeitpunkt konnte bei einem der drei Versuchsansätze eine Freisetzung des Zytokins aus den KB-Zellen nachgewiesen werden. Die Sezernierung des Wachstumsfaktors TGF-β1 korrelierte bei beiden Stämmen indirekt mit der Menge des zugegebenen Moxifloxacins.

Zusammengefasst kann dem Fluorchinolon Moxifloxacin eine gute Wirksamkeit gegenüber den untersuchten Bakterienstämmen bestätigt werden. Bereits niedrige Konzentrationen führten zu einer deutlichen Reduktion der Erregerzahlen, höhere Antibiotikumkanzenzen ermöglichten die vollständige Eliminierung der Mikroorganismen. Zudem ist das Antibiotikum offensichtlich in der Lage, die Freisetzung von IL-8 aus oralen Epithelzellen zu fördern und somit eventuell die lokale Immunantwort zu stimulieren. Moxifloxacin sollte daher als Option bei der adjuvanten Antibiotikatherapie parodontaler Erkrankungen in klinischen Studien Berücksichtigung finden.

2. Einleitung

2.1. Definition und Klassifikation der Parodontitis

Die Parodontitis entsteht als Folge komplexer Wechselwirkungen zwischen bakteriellen Infektionen des Zahnhalteapparates und der Abwehr des betroffenen Organismus (Wolff et al. 1994). Im Rahmen der Erkrankung kommt es zum Verlust des parodontalen Attachments, was die Unterbrechung der Anheftung am Zahn zur Folge hat, sowie zur Resorption des Alveolarknochens (Page and Schroeder 1982). Als ursächlich gilt, unter Berücksichtigung der Allgemeinkonstitution des Wirtsorganismus, vor allem das Vorhandensein gramnegativer, anaerober bzw. mikroaerophiler Bakterien wie *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia* (Bragd et al. 1987). Klinische Parameter der Erkrankung sind Entzündungen der Gingiva, Bluten auf Sondieren, die Sondierungstiefe der Zahnfleischtaschen, Attachmentverlust, sowie der radiologisch erkennbare Knochenabbau (Genco 1990). Eine Auswertung dieser Faktoren allein ermöglicht jedoch keine Prognose auf die zukünftige Entwicklung einer Parodontitis, sie dokumentiert lediglich den bisherigen Verlauf (Persson and Page 1992). Im histopathologischen Bild sind sowohl der Verlust bindegewebiger Elemente als auch die Knochenresorption erkennbar und es überwiegen Plasmazellen (Hellwig et al. 1999). Ähnlichkeiten zwischen Gingivitis und Parodontitis bestehen, doch Beweise, dass eine Parodontitis die unvermeidbare Folge einer Gingivitis ist, konnten bisher nicht erbracht werden.

1989 einigten sich die Teilnehmer des World Workshops in Clinical Periodontics bereits auf eine internationale Einteilung parodontaler Erkrankungen. Darin enthaltene Unklarheiten wie beträchtliche Überschneidungen innerhalb der einzelnen Kategorien oder unzureichende bzw. uneindeutige Zuordnungskriterien ließen in den nächsten Jahren jedoch mehrere Modifikationen folgen. Die aktuelle Klassifikation gilt seit Oktober 1999 und beinhaltet folgende Einteilungsmöglichkeiten:

1. Chronische Parodontitis
2. Aggressive Parodontitis
3. Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung
4. Nekrotisierende Parodontalerkrankung

5. Parodontaler Abszess
6. Parodontal-Endodontale Läsion
7. Gingivale Vergrößerungen
8. Gingiva- und Weichgewebswucherung

(Armitage 1999)

Hierbei ersetzt die Bezeichnung chronische Parodontitis weitestgehend den bis dahin verwendeten Begriff der Erwachsenenparodontitis. Die Erkrankung, durch eine Entzündung des Parodontiums mit zunehmendem Attachment- und Knochenverlust gekennzeichnet, kann je nach Anzahl betroffener Messpunkte in eine lokalisierte und eine generalisierte Form unterschieden werden. Sie tritt in jedem Lebensalter auf, jedoch steigen Inzidenz und Ausmaß mit zunehmendem Alter an. Die chronische Erkrankung ist plaqueinduziert und gilt als häufigste Form der Parodontitis (Armitage 1999).

Als aggressive Parodontitis werden heute Erkrankungen beschrieben, die durch eine rasche Progression mit hochgradigem Attachmentverlust und massivem Knochenabbau gekennzeichnet sind. Die Patienten weisen meist eine gute Mundhygiene auf und sind sonst klinisch gesund. Bei der Untersuchung werden oftmals eine Überreaktion von Makrophagen mit erhöhten IL-1 β und Prostaglandin E₂-Spiegeln sowie eine abnormale Phagozytenfunktion diagnostiziert. Diese Krankheitsform, die vor allem jüngere Menschen betrifft und ebenfalls in eine lokalisierte und eine generalisierte Form unterschieden werden kann, ist aus dem früher verwendeten Terminus Early Onset Periodontitis hervorgegangen (Armitage 1999).

2.2. Pathogenese der Parodontitis

Die Pathogenese dieser Erkrankung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es handelt sich aber sicher um eine Reaktion des Wirtsorganismus auf spezielle Mikroorganismen der supra- und subgingivalen Plaque. Diese Bakterien induzieren in Abhängigkeit bestimmter Risikofaktoren durch Freisetzung von Zytokinen, Matrixmetallproteinasen und Prostaglandinen sowohl den Attachmentverlust als auch den Abbau des alveolären Knochens (Kornman and Page 1997). Als bedeutendste Risikofaktoren gelten das Rauchen und systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder HIV (The American Academy of Periodontology 1996). Auch Umwelteinflüsse wie Stress, soziales Umfeld und physische Verfassung (Wakai et al. 1999),

zunehmendes Lebensalter und das Vorhandensein spezieller Bakterien wie *T. forsythia* (Machtei et al. 1999) sowie die Motilität der subgingivalen Mikroflora (Ojima et al. 2000) sollen die Progression der Erkrankung beeinflussen. Als genetische Risikofaktoren werden eine reduzierte Immunglobulin G₂-Produktion, eine abnormale Phagozytenfunktion, sowie diverse Polymorphismen im Bereich des IL-1-Gens, des TNF- α -Gens oder des Cyclooxygenase-1-Gens beschrieben (Page 1999).

2.3. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* - bedeutend bei Manifestation und Progredienz der Parodontitis

Der Mensch kommt ohne intraorale Mikroorganismen - also keimfrei zur Welt. Doch bereits nach wenigen Stunden haben sich die Erstbesiedler niedergelassen, unter ihnen Sprosspilze, Laktobazillen und orale Streptokokken. Hinzu kommen später Staphylokokken, kariogene Streptokokken, Aktinomyzeten und Veillonellen. Zusammengefasst beherbergt die Mundhöhle des bezahnten Patienten mehr als 400 Bakterienarten. So ist es nicht verwunderlich, dass eine parodontale Tasche allein 300 verschiedene Spezies mit einer Konzentration von bis zu 10⁸ Mikroorganismen pro Messpunkt aufweisen kann (Moore and Moore 1994). Die meisten von ihnen sind saprophytär, d.h. sie lösen keinerlei pathogene Veränderungen am Wirtsorganismus aus. Von einigen ist aber heute bekannt, dass sie eine große Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung parodontaler Erkrankungen spielen. Zu ihnen gehören neben *T. forsythia*, *P. intermedia* oder *T. denticola* vor allem *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* (Genco et al. 1996, Ximenez-Fyvie et al. 2000). Sie werden daher im Folgenden näher beschrieben.

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Bei *A. actinomycetemcomitans* handelt es sich um ein gramnegatives, mikroaerophiles, fakultativ anaerobes Stäbchen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,4±0,1 x 1,0±0,4 µm. Im Jahre 1912 wurde es erstmals als Begleitkeim der Aktinomykose isoliert (Klinger 1912). Heute werden fünf Serotypen beschrieben (a, b, c, d, e), wobei die meisten klinischen Isolate dem Typ b zugeordnet werden (Zambon et al. 1983a). *A. actinomycetemcomitans* bildet kleine, rundliche, helle Kolonien. Nach ihrer Oberflächenbeschaffenheit können Stämme mit glatter und transparenter Oberfläche von solchen mit rauer und opaker Oberfläche

unterschieden werden. Diese Abweichungen im Erscheinungsbild erklären sich durch das Vorhandensein von Fimbrien bei den opaken Kulturen. Fimbrien ermöglichen den Mikroorganismen eine bessere Adhärenz an die Wirtszellen (Rosan et al. 1988). Ein weiteres Strukturmerkmal von *A. actinomycetemcomitans* sind die extrazellulären membrangebundenen Vesikel. Es handelt sich dabei um Lipopolysaccharide (Fives-Taylor et al. 1999).

Die pathogenen Mechanismen von *A. actinomycetemcomitans* sind noch nicht aufgeklärt, doch einige Virulenzfaktoren wie Invasion, Adhärenz und Antibiotikaresistenzen sind bekannt. Auch das *A. actinomycetemcomitans* Leukotoxin, die Kollagenasen, Lipopolysaccharide, Bakteriozine, immunsuppressive Faktoren, Fc bindende Proteine und Faktoren, welche die Chemotaxis inhibieren, spielen eine Rolle (Fives-Taylor et al. 1999).

Adhärenz und Invasion haben sich hierbei als wichtige Faktoren herauskristallisiert. Die Kolonisation und Penetration des gingivalen Verbandes und der parodontalen Taschen durch die Mikroorganismen stellen den kritischen Beginn einer Parodontalerkrankung dar (Meyer and Fives-Taylor 1997).

In vitro-Untersuchungen belegen, dass *A. actinomycetemcomitans* in der Lage ist, sich sowohl an extrazelluläre Matrix-Proteine als auch an epitheliale Zelllinien und Gingivaepithelzellen anzuheften und in diese einzudringen (Fives-Taylor et al. 1999). Optimale Adhärenz wird bei stoffwechselaktiven Stämmen beobachtet und ist sowohl fimbrienreichen als auch den fimbrienarmen Spezies, dann über die extrazellulären Bläschen, möglich (Meyer and Fives-Taylor 1994).

Bei der Invasion handelt es sich um einen dynamischen, mehrstufigen Prozess, der, nach Kontakt der Mikroorganismen mit den gebildeten Mikrovilli der Wirtszelle, den Eintritt in die Zelle durch Bindung an einen Rezeptor, das Eindringen und Verlassen der membrangebundenen Vakuolen, die rasche Vermehrung im Zytoplasma, den Austritt aus der Wirtszelle sowie die Ausbreitung innerhalb der Zellkomplexe umfasst (Meyer et al. 1996). Der genaue Eintrittsweg ist noch nicht gefunden, eine Actin-Abhängigkeit, ein Transferrin-Rezeptor oder das Vorhandensein spezieller Peptidsequenzen (Arginin, Alanin) werden diskutiert (Meyer and Fives-Taylor 1997). *A. actinomycetemcomitans* persistiert nicht in den Zellen (Meyer et al. 1996). Als Mediatoren für den Austritt aus den Vakuolen gelten α/β -

Hämolysin (Avila-Campos 1995) bzw. Phospholipase C (Meyer and Fives-Taylor 1997). Vor Verlassen der Zellen kommt es innerhalb des Zytoplasmas zu massiver Keimvermehrung (Meyer et al. 1996). Die rasche inter- und intrazelluläre Ausbreitung von *A. actinomycetemcomitans* ist im Gegensatz zu der anderer Mikroorganismen nicht Actin-abhängig. Intrazellulär wird sie durch die enorm hohen Replikationsraten erklärt, extrazellulär durch Kontakt zu den Mikrotubuli der Wirtszellen und den damit verbundenen Ausbildungen von Protrusionen. Solche mikroskopisch sichtbaren Ausstülpungen der Zellmembranen entstehen durch keiminduzierte Verbindungen zweier aneinander liegender Epithelzellen und Einstülpungen einer Zelle in eine andere. Die Bakterien penetrieren in die Zellen, lagern sich innerhalb an und werden bei Zelllyse frei (Fives-Taylor et al. 1999).

Bei dem von *A. actinomycetemcomitans* gebildeten Leukotoxin handelt es sich um ein 116 kDa schweres Protein aus der Familie der RTX-Toxine. Es ändert die Permeabilität der Zellmembran und zerstört die Abwehrzellen des Wirtsorganismus via Osmose (Zambon et al. 1983b).

Porphyromonas gingivalis

Das obligat anaerob lebende Bakterium *P. gingivalis* gehört in die Gruppe der nicht fermentativen, gramnegativen Stäbchen. Es bildet grünschwartz pigmentierte Kolonien. In den letzten Jahren konnten diverse Genotypen mit unterschiedlicher Virulenz isoliert werden, wobei der Patient jeweils nur Träger eines Klons ist (Loos et al. 1993, Teanpaisan et al. 1996). Die Oberflächenstruktur vieler *P. gingivalis*-Stämme ist durch das Vorhandensein von Fimbrien gekennzeichnet, die den Bakterien eine bessere Adhärenz ermöglichen (Njoroge et al. 1997).

Als Zweit- oder Spätbesiedler der Mundhöhle ist *P. gingivalis* in der Lage, sich an permanente Zelllinien und Gingivaepithelzellen (Weinberg et al. 1997) ebenso anzuheften, wie an die Erstbesiedler der oralen Kavität, die oralen Streptokokken (Lamont et al. 1992a) und *A. naeslundii* (Goulbourne and Ellen 1991). Zudem kann er sich an Speichelbestandteile wie prolinreiche Proteine und Glykoproteine (Amano et al. 1998), an Fibrinogen, Fibronectin (Murakami et al. 1996) und Lactoferrin (Sojar et al. 1998) binden. Ist *P. gingivalis* also einmal in einen anfälligen Wirtsorganismus gelangt, sichern diese multiplen Möglichkeiten der Adhärenz die Persistenz in der Mundhöhle.

Hinzu kommt die Fähigkeit der Invasion. Es konnte belegt werden, dass *P. gingivalis* in KB-Zellen, orale Epithelzelllinien (Duncan et al. 1993, Njoroge et al. 1997) und in Gingivaepithelzellen (Sandros et al. 1994) eindringen kann. Ähnlich wie bei *A. actinomycetemcomitans* wird eine rezeptorvermittelte Endozytose vermutet (Lantz 1996), wobei die Wirtszellen nicht beschädigt werden. *P. gingivalis* persistiert dann innerhalb der Zellen und vermehrt sich (Madianos et al. 1996).

Befinden sich die Mikroorganismen in den Wirtszellen, sind sie weder für verabreichte Antibiotika zugänglich (Lantz 1996), noch kann sie die Wirtsabwehr eliminieren. Sowohl die Aktivierung des Komplementsystems als auch die Antikörperbildung bleiben durch fehlenden Kontakt mit den Molekülen des Immunsystems aus.

Adhärenz, Invasion und Persistenz stellen somit bedeutende Virulenzfaktoren dieses Bakteriums dar. Auch Kapsel-Polysaccharide (Schifferle et al. 1993) und das Endotoxin Lipopolysaccharid als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien (Bainbridge and Darveau 2001) spielen eine Rolle.

Des Weiteren ist bekannt, dass *P. gingivalis* Enzyme wie Kollagenasen, Fibrinolysin, Proteasen und Phospholipase A bildet und zudem die toxischen Stoffwechselprodukte Ammoniak, Schwefelwasserstoff und Fettsäuren produziert (Singer and Buckner 1981, Bramanti and Holt 1991).

85% der proteolytischen Aktivität des Anaerobiers machen jedoch die so genannten Gingipaine aus (Potempa et al. 1997). Es handelt sich hierbei um arginin- bzw. lysin-spezifische Cysteinproteasen, für deren Synthetisierung mindestens drei Gene verantwortlich sind. Die Gene Gingipain R1 und Gingipain R2 sind zuständig für die argininspezifischen, während das Gingipain K-Gen die lysinspezifischen Proteasen bildet (Pavloff et al. 1997, Mikolajczyk-Pawlinska et al. 1998). Gingipaine spalten IgG, Serum-IgA und sekretorisches IgA (Abe et al. 1998), bauen Kollagen I und IV ab (Kadowaki et al. 1994), verhindern die Koagulation des Fibrinogens (Scott et al. 1993) und sind in der Lage, die Komplementfaktoren C3 und C5 abzubauen (Wingrove et al. 1992). All diese Fähigkeiten schützen *P. gingivalis* wirkungsvoll vor der Wirtsabwehr.

2.4. Die Schlüsselfunktion der Zytokine bei der parodontalen Erkrankung

Spezifische bzw. unspezifische Immunreaktionen werden vom Wirtsorganismus ausgelöst, um Infektionen und daraus folgende Erkrankungen abzuwenden.

An vorderster Front stehen dabei die polymorphkernigen Granulozyten, die via Phagozytose und Freisetzung antimikrobiell wirkender Substanzen agieren. Sie bilden eine Grenze zwischen Plaque und Geweboberfläche und sollen das Eindringen der Bakterien oder ihrer Produkte ins Gewebe verhindern (Hart et al. 1994).

Die Neutrophilen werden unterstützt von den B-Zellen. Diese werden von Antigenen wie den Lipopolysacchariden der Mikroorganismen direkt aktiviert und initiieren die vermehrte Bildung spezifischer Antikörper (Baker and Wilson 1989). Diese opsonieren dann die Erreger und aktivieren das Komplementsystem, um die Eindringlinge gemeinsam mit den Neutrophilen zu eliminieren (Wilson and Genco 1989), oder sie inaktivieren die Mikroorganismen direkt durch Neutralisierung bakterieller Enzyme und Toxine (Ebersole 1990). Auch die T-Lymphozyten sind an Abwehrreaktionen beteiligt. Neben anderen Zellen sind sie in der Lage, Zytokine zu produzieren. Diese Zytokine haben eine Schlüsselfunktion bei der Immunabwehr und sollen daher detaillierter erklärt werden.

Zytokine sind niedermolekulare, lösliche Proteine oder Peptide, die als Botenstoffe wichtige Zellfunktionen regulieren. Sie sind für die Aufrechterhaltung eines komplizierten Netzwerks zwischen gleich- und andersartigen Zellen verantwortlich und außerdem an Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung, Regeneration, Reparatur und Entzündung beteiligt. Zytokine müssen dazu an ihre entsprechenden Zelloberflächenrezeptoren binden, wodurch intrazellulär eine Signaltransduktion und schließlich der Effekt ausgelöst werden. Zudem existieren aber auch lösliche Rezeptoren, die nicht auf einer Zelle lokalisiert sind. Zytokine sind bereits in geringsten Konzentrationen wirksam und werden entweder kontinuierlich oder nach Stimulation vorübergehend sezerniert.

Anders als früher angenommen übernehmen verschiedene Zelltypen die Produktion, darunter Makrophagen, PMNs, Lymphozyten, Endo- und Epithelzellen sowie gingivale und desmodontale Fibroblasten. Die Zytokine sind multifunktionell und ihre biologischen Aktivitäten überschneiden sich (Balkwill and Burke 1989, Hamblin 1993, Okada and

Murakami 1998). Daher sind sie essentiell für die Bereitstellung einer funktionierenden Immunabwehr, können aber bei unkontrollierter, überschießender Freisetzung ebenso zerstörend und krankheitsfördernd wirken (Kelso 1990). So sind sie in alle wichtigen Vorgänge bei der Entstehung einer Gingivitis und Parodontitis involviert: Anbindung der Leukozyten an die subepithelialen Endothelien, chemotaktische Führung dieser Zellen von den Gefäßen in Richtung Biofilm, Aktivierung der immunoinflammatorischen Zellen, Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen sowie Knochen- und Attachmentverlust (Deschner 2000).

Zur Gruppe der Zytokine zählen heute die Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, zytotoxische, aktivierende oder inhibierende Faktoren und die Interkrine. Parodontitisrelevant sind dabei vor allem IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α , die auch als inflammatorische Zytokine bezeichnet werden, sowie der Wachstumsfaktor TGF- β .

Interleukin -1

Das IL-1-System besteht aus zwei Rezeptoren (IL-1R I und IL-1R II) und drei Liganden (IL-1 α , IL-1 β und IL-1ra). Die biologischen Aktivitäten der Polypeptide sind dabei sehr ähnlich, wobei die Freisetzung von IL-1 β die von IL-1 α um das 10-50 fache übersteigt (Tatakis 1993). Während IL-1 β zudem meist frei agiert, verbleibt IL-1 α membrangebunden (Dinarello 1991). Beide entfalten ihre Effekte auf Zellen, indem sie an IL-1 R I auf der Zelloberfläche binden. Auch das Glykoprotein IL-1ra kann an diesen Rezeptor binden, es wird dabei jedoch kein biologisches Signal getriggert. Kontaktieren die Liganden IL-1 R II, wird ebenfalls kein Effekt ausgelöst (Starnes 1991, Dinarello 1994).

IL-1, das von allen bereits angeführten Zellarten sezerniert werden kann, entfaltet seine Wirkung auf zahlreiche Zelltypen und -funktionen. So animiert das Polypeptid Endothelzellen zur Expressierung ihrer Adhäsionsmoleküle, wodurch die Anheftung von Leukozyten und die Rekrutierung dieser immunoinflammatorischen Zellen an den Ort der Entzündung gefördert werden. Des Weiteren stimuliert es die Proliferation von Keratinozyten, Fibroblasten und Epithelzellen und steigert zudem die Produktion von Prokollagen Typ I und Fibronektin durch die Fibroblasten. IL-1 stellt aufgrund dieser Fähigkeiten eine kritische Komponente für das Gleichgewicht des parodontalen Gewebes dar und eine unkontrollierte IL-1 Produktion führt umgehend zum Gewebeschaden (Hefti 2000, Okada and Murakami 1998).

In Fibroblasten induziert IL-1 die Produktion von Prostaglandin E₂. Es hemmt die Knochenkollagenbildung und fördert gleichzeitig die Knochenresorption. Auch Matrixmetallproteinase, die zum Abbau des parodontalen Bindegewebes und Knochens führen, werden vermehrt synthetisiert (Okada and Murakami 1998). IL-1 unterdrückt dabei den intrazellulären physiologischen Kollagenabbau, während die Freisetzung von extrazellulären kollagenolytischen Enzymen subventioniert wird (van der Zee et al. 1997).

Ligamentzellen, die im Gesunden für die Verbindung zwischen Zahn und Alveolarknochen sorgen und am Knochenaufbau beteiligt sind, stellen ihre Arbeit unter Anwesenheit von IL-1 ein (Agarwal et al. 1998). Die Knochenresorption wird demnach unter gleichzeitiger Hemmung der Knochenneubildung gefördert (Stashenko et al. 1987). Hierbei erscheint IL-1 β am effektivsten (Alexander and Damoulis 1994).

Es ist bekannt, dass die Interleukine IL-4, IL-10 und IL-11 die Freisetzung von IL-1 hemmen. So konnten Martuscelli et al. (2000) im Tierversuch zeigen, dass die subkutane Gabe von IL-11 den parodontalen Attachmentverlust signifikant verringert hat.

Die löslichen IL-1-Rezeptoren sowie der IL-1ra-Rezeptor wirken als kompetitive Antagonisten und haben dadurch ebenfalls Einfluss auf die Freisetzung dieses Zytokins (Assuma et al. 1998, Graves et al. 1998).

Dennoch belegen diverse Studien, dass im Falle einer parodontalen Erkrankung erhöhte IL-1- und sinkende IL-1ra-Konzentrationen im Gewebe und in der Sulkusflüssigkeit vorzufinden sind und die Progredienz umso rascher und tiefgreifender verläuft, je höher dieser IL-1-Spiegel ist (Jandinski et al. 1991, Preiss and Meyle 1994, Rawlinson et al. 2000). Erklärt wird dies durch eine Verschiebung des parodontalen Gleichgewichtes zugunsten der Entzündung, hervorgerufen durch eine Überreaktion der wirtseigenen Immunabwehr (Graves and Cochran 2003). IL-1 gilt daher als entscheidender Mediator bei parodontalen Entzündungs- und Abbauvorgängen.

Tumornekrosefaktor - α

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vor allem von Makrophagen und Monozyten sezerniert wird. Die Lipopolysaccharide der gramnegativen Bakterien dienen dabei als Stimulus (Van Dyke et al. 1993). TNF- α interagiert mit zwei spezifischen

Membranrezeptoren, p55 und p75 (Tracey 1994) und induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen und die Freisetzung von matrixabbauenden Enzymen. In ruhenden Makrophagen stimuliert TNF- α die Synthesen von IL-1 und Prostaglandin E₂ (Elias et al. 1987). Zudem fördert er die Knochenresorption durch Aktivierung von Osteoklasten und hemmt die Knochenbildung (Bertolini et al. 1986, van der Pluijm et al. 1991). TNF- α ist dem IL-1 in seinen biologischen Aktivitäten folglich sehr ähnlich, agiert jedoch in geringerem Ausmaß.

Interleukin - 6

Bei IL-6 handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin, das sowohl Entzündungsreaktionen als auch die Immunantwort des Wirtsorganismus beeinflusst (Hirano 1991). Es wird von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet, sowie nach Stimulation auch von Makrophagen und T- bzw. B-Zellen (Okada and Murakami 1998).

Seine biologischen Effekte werden durch einen Rezeptor vermittelt, der aus zwei Polypeptidketten besteht (p80 und gp130). Das p80-Protein kann IL-6 binden und dieser entstandene Komplex lagert sich nachfolgend an gp130 an, wodurch die Signalübertragung realisiert wird. Einige parodontale Zellen besitzen jedoch nur das für die Signaltransduktion verantwortliche gp130. Der fehlende Rezeptoranteil kommt aber in hoher Konzentration im entzündeten gingivalen Gewebe vor und ist somit zur Komplettierung verfügbar (Naruishi et al. 1999).

IL-6 ist an der Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen beteiligt (Kikutani et al. 1985). Die Stimulation der Antikörperbildung erfolgt so massiv, dass 140-200 fache Serumspiegel von IgG nachgewiesen werden konnten (Kono et al. 1991). Außerdem erhöht IL-6 die Anzahl der Osteoklasten und deren Vorläuferzellen, stimuliert die Knochenresorption und hemmt die Knochenbildung (Lowik et al. 1989, Ohsaki et al. 1992).

Interleukin - 8

IL-8 zählt sowohl in die Gruppe der Interleukine als auch zu den Chemokinen. Sezerniert wird es von Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen. Auch gingivale Fibroblasten können, stimuliert durch die Lipopolysaccharide der gramnegativen Bakterien, zur Freisetzung von IL-

8 animiert werden (Tamura et al. 1992, Yoshimura et al. 1997). So konnten Sfakianakis et al. (2001) zeigen, dass die Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* einen Konzentrations-abhängigen Anstieg der IL-8-Sekretion bei gingivalen Epithelzellen verursacht.

Durch die subgingivalen Mikroorganismen werden zunächst die PMNs in der parodontalen Tasche und benachbarte Epithelzellen zur IL-8-Sekretion angeregt. Es entsteht folglich ein IL-8-Konzentrationsgradient zwischen Biofilm und subepithelialen Gefäßen, der als Leitschiene für die Rekrutierung neuer PMNs dient. Er geht verloren, wenn durch Fortschreiten der Erkrankung auch subepithelial lokalisierte Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen oder Makrophagen animiert werden, IL-8 zu produzieren. Die PMNs werden dann auch subepithelial akkumuliert und aktiviert, und setzen dort zahlreiche Entzündungsmediatoren und Enzyme, die zum Knochen- und Attachmentverlust führen, frei (Buchmann et al. 2002).

Die Ausschüttung von IL-8 ist in Anwesenheit von IL-1 β und TNF- α erhöht (Bickel 1993, Otake et al. 1993).

Transforming Growth Factor - β

Von Wachstumsfaktor TGF- β sind drei Isoformen bekannt: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3. Sie werden von verschiedenen Genen codiert. TGF- β gilt als wirkungsvollster Wachstums-hemmer für Epi- und Endothelzellen, Fibroblasten, neuronale Zellen, Lymphozyten und Hepatozyten. Er stimuliert zudem die Synthese von Kollagen, Fibronectin, Proteoglykanen, Osteonectin und anderen Stoffen und hat Einfluss auf die Knochenbildung (Okada and Murakami 1998). Auf die Synthese von Matrixmetallproteinasen, wie Kollagenasen, wirkt er hemmend (Overall et al. 1991). Da er vor allem den physiologischen intrazellulären Kollagenabbau fördert und den extrazellulären gleichzeitig unterdrückt, gilt TGF- β als Hauptantagonist zu IL-1 (van der Zee et al. 1997). Zudem ist er in der Lage, die Produktion der proinflammatorischen Interleukine IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α zu senken (Chantry et al. 1989, Musso et al. 1990) und die Adhäsion von Leukozyten an Epithelzellen in vitro zu verhindern (Gamble and Vadas 1991). Die Freisetzung von IL-1ra nimmt in Anwesenheit von TGF- β zu (Turner et al. 1991).

TGF- β ist folglich ein Zytokin, das die Wundheilung stimuliert. In entzündetem Parodontalgewebe konnte es in 100-fach höherer Konzentration nachgewiesen werden als im Gesunden. Untersucht wurden dabei vor allem das Bindegewebe, das an das Taschenepithel angrenzt, die Lamina propria sowie die Nachbarschaft des oralen Epithels (Steinsvoll et al. 1999). Eine Hochregulation dieses Zytokins könnte somit helfen, die destruktiven Entzündungsreaktionen auszugleichen.

2.6. Therapie der Parodontitis unter möglicher Berücksichtigung des Fluorchinolons Moxifloxacin

Ziel jeder Parodontitisbehandlung ist es, die pathogenen Mikroorganismen aus der Mundhöhle zu eliminieren und weitere Ansiedelungen zu verhindern. Parodontale Entzündungen sollen reduziert und zunehmender Attachmentverlust und Knochenabbau müssen abgewendet werden. Es stehen dafür drei Therapiekomplexe zur Auswahl, die auch miteinander kombiniert werden können:

1. Die konservative, nicht chirurgische Behandlung,
2. die chirurgische Versorgung und
3. die Gabe von Antibiotika zur Eliminierung der pathogenen Mikroorganismen.

Eine Optimierung der Mundhygiene, sowohl vom Patienten allein zu Hause durchgeführt als auch professionell unterstützt in der Zahnarztpraxis, muss allen Verfahren vorangestellt werden. Chemische Mittel wie Chlorhexidin (Stanley et al. 1988) oder Triclosan (Svatun et al. 1993) können dabei ergänzend verwendet werden. Sie wirken antibakteriell und plaque- bzw. entzündungsreduzierend.

Die konservative, nicht chirurgische Therapie, bestehend aus Scaling und Wurzelglättung, gilt seit langem als goldener Standard bei der Behandlung parodontaler Läsionen (Pihlstrom et al. 1983, Lindhe et al. 1984). Sie wurde bereits 2000 v. Chr. in ägyptischen Hieroglyphen und medizinischen Papyri erstmals beschrieben (Weinberger 1948). Diverse Studien belegen, dass dieses Verfahren vor allem bei mittleren Taschentiefen bis fünf Millimeter sowohl zu einer Reduktion der Sondierungstiefe als auch zu einer Zunahme des Attachmentniveaus führt (Cugini et al. 2000, Hung and Douglass 2002). Auch eine Verminderung der pathogenen

Keimkonzentrationen konnte nach erfolgter Behandlung festgestellt werden (Haffajee et al. 1997, Cugini et al. 2000). Die Wahl des Instrumentes, ob Gracey-Kürette oder Ultraschallgerät, hat dabei keinen Einfluss auf den Therapieerfolg (Copulos et al. 1993).

Bei tiefen Taschen über fünf Millimeter sehen manche Autoren bessere Erfolgsaussichten in der chirurgischen Therapie (Hung and Douglass 2002), da die Gingivektomien oder divers modifizierte Lappenoperationen dem Behandler direkten Zugang zu den Wurzeloberflächen und Knochendefekten ermöglichen. Auch die Plaquekontrolle gestaltet sich für den Patienten im Anschluss einfacher.

Antibiotika finden in der Medizin Verwendung, seit das von Fleming 1928 gefundene Penicillin 1941 synthetisch hergestellt werden konnte. In den darauf folgenden Jahren wurden unzählige Medikamente entwickelt, unter ihnen Antibiotika wie Metronidazol, Amoxicillin, Doxycyclin und Clindamycin zur Bekämpfung infektiöser Parodontalerkrankungen (Feres et al. 2002). Da die Wirkungsspektren dieser Medikamente variieren, sollte vor der Verabreichung ein Antibiotogramm zur Bestimmung des effektivsten Präparates erstellt werden (van Winkelhoff et al. 1989). Die Applikation kann dann lokal oder systemisch erfolgen.

Vorteile der lokalen Gabe durch geeignete Trägersubstanzen wie Gele, Chips oder Fäden sind das sichere Erreichen tiefer oder therapieresistenter Taschen und das Erzielen relativ hoher Konzentrationen am Ort des Geschehens ohne Belastung des Gesamtorganismus.

Klinisch unauffällige mikrobiologische Retentionsnischen bedürfen jedoch einer systemischen Medikation. Zwar müssen dabei mögliche Nebenwirkungen auf den Wirt oder Anwendungseinschränkungen berücksichtigt werden, doch können auch Reinfektionen laut Mombelli et al. (2002) nur auf diesem Weg verhindert werden.

Diverse Studien stimmen darin überein, dass eine alleinige Antibiotikatherapie, gleich, auf welche Art appliziert, zur vollständigen Eliminierung der Infektion jedoch nicht ausreichend ist (Mombelli et al. 2002, Eick and Pfister 2004), in Kombination mit manueller oder maschineller Behandlung aber ein langfristiger Therapieerfolg ermöglicht werden kann (Sigusch et al. 2001). Begründet wird dies durch die instrumentelle Zerstörung des Biofilms im gingivalen Sulkus, in dem bei erkrankten Patienten die anaeroben bzw. mikroaerophilen gramnegativen Bakterien persistieren, durch Scaling und Wurzelglättung und die dadurch

besseren Zugriffsmöglichkeiten des Antibiotikums (Müller et al. 2002).

Moxifloxacin

Bei dem Antibiotikum Moxifloxacin handelt es sich um ein 8-Methoxychinolon mit bityklischem Amin-Substituent an Position 7 (Abb. 1). Es zählt zu der Gruppe IV der Fluorchinolone, die sich durch eine verbesserte Aktivität gegenüber anaeroben Mikroorganismen auszeichnen (PEG 1998).

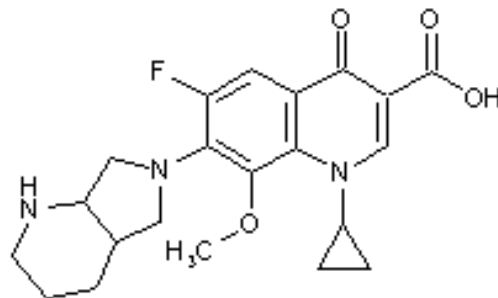


Abb. 1: Strukturformel des Fluorchinolons Moxifloxacin

Der für die stark bakterizide Wirkung verantwortliche Mechanismus basiert auf der Hemmung der ATP-abhängigen und DNS-Gyrase-katalysierten DNS-Verschraubungsreaktion. Die Gyrasen vom Topoisomerase-Typ II und IV sind für die Bakterien essentiell bei der Replikation, Transkription und Reparation der bakteriellen DNS. Moxifloxacin inhibiert diese Gyrasen, die Spiralbildung bleibt aus und die DNS ist folglich nicht mehr decodierbar (Oberdisse 2002).

Moxifloxacin verfügt über ein breites Wirkspektrum, gerichtet gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie Anaerobier (Dalhoff et al. 1996), da es in der Lage ist, sich auf noch unklarem Wege in Epi- bzw. Endothelzellen, Fibroblasten und PMNs anzusammeln (Pascual 1995) und dort aktiv zu verweilen. Penetration und Verteilung erfolgen schnell und zum Teil reversibel, zu einer intrazellulären Sättigung kommt es nicht (Pascual et al. 1999). Sowohl im Plasma als auch im Speichel konnten nach Gabe des Medikamentes Konzentrationen gemessen werden, die oberhalb der MHK der pathogenen Mikroorganismen lagen. Die Halbwertszeit von Moxifloxacin beträgt 13 h. Es wird überwiegend hepatisch metabolisiert und eliminiert (Stahlmann und Lode 2005).

Moxifloxacin wird in der Humanmedizin bereits mit gutem Erfolg zur Behandlung von Atemwegserkrankungen eingesetzt. Die Applikation erfolgt sowohl oral als auch intravenös (Stahlmann und Lode 2005). In Bezug auf die Parodontitis verursachenden Bakterien liegen bisher nur vereinzelte in vitro-Studien vor. Diese bestätigen dem Antibiotikum Moxifloxacin eine gute Wirksamkeit gegenüber den parodontopathogenen Mikroorganismen (Müller et al. 2002, Eick and Pfister 2004).

3. Zielstellung

In dieser in vitro-Studie an Epithelzellen soll die antibakterielle Wirkung des Fluorchinolons Moxifloxacin gegenüber den parodontopathogenen Mikroorganismen *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 untersucht werden.

Beide Bakterienstämme verfügen über die Fähigkeiten, sich an Epithelzellen anlagern und in diese einzudringen. *P. gingivalis* ATCC 33277 ist zudem in der Lage, intrazellulär zu persistieren. In den Zellen sind die Keime der Immunabwehr des Wirtes nicht zugänglich. Es muss folglich untersucht werden, ob Moxifloxacin neben den adhärenenten Mikroorganismen vor allem auch die Zahl der internalisierten Erreger reduziert.

Die Versuche werden an KB-Zellen durchgeführt, die einem oralen Epidermoidkarzinom entstammen und eine permanente Zelllinie darstellen. Neben zwei therapeutischen Dosierungen (2,5 µg/ml und 100 µg/ml) soll zudem eine subinhibitorische Antibiotikumkonzentration (1/4 MHK) untersucht werden. Die Mikroorganismen werden den KB-Zellen zeitgleich mit dem Moxifloxacin zugegeben und jeweils 1 h, 6 h und 18 h inkubiert. Im Anschluss erfolgt durch die Auswertung der KBE die Ermittlung der noch vitalen adhärenenten, internalisierten und frei vorkommenden *A. actinomycetemcomitans* Y4 bzw. *P. gingivalis* ATCC 33277.

Um feststellen zu können, ob Moxifloxacin isolierte Effekte auf die verwendeten KB-Zellen oder die Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4 bzw. *P. gingivalis* ATCC 33277 auslöst, sollen sowohl die KB-Zellen als auch die Bakterienstämme in weiteren Versuchsansätzen jeweils für 1 h mit den drei Moxifloxacinkonzentrationen vorinkubiert werden.

Des Weiteren ist zu untersuchen, ob die Zugabe von Moxifloxacin die Freisetzung der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und TGF- β 1 aus den bis zu 18 h mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 bzw. *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Epithelzellen beeinflusst. Damit soll geklärt werden, ob das Fluorchinolon über immunmodulatorische Fähigkeiten verfügt und es infolgedessen die wirtseigene Abwehr stimulieren könnte.

4. Material und Methoden

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden anhand von drei verschiedenen Versuchsansätzen ermittelt:

- I. Einstündige Vorinkubation des Antibiotikums Moxifloxacin mit den KB-Zellen.
- II. Einstündige Vorinkubation des Antibiotikums Moxifloxacin mit den Bakterien (*P. gingivalis* ATCC 33277 oder *A. actinomycetemcomitans* Y4).
- III. Mischansatz: gleichzeitiges Zugeben des Bakterienstammes *A. actinomycetemcomitans* Y4 oder *P. gingivalis* ATCC 33277 sowie des Antibiotikums Moxifloxacin zu den KB-Zellen.

Allen Ansätzen gemeinsam war die Vorbereitung der jeweiligen Materialien vor Versuchsbeginn.

4.1. Anzucht der Zellen

Für alle Versuche wurden KB-Zellen verwendet, die aus der Zelllinie eines oralen Plattenepithels stammen. Mit dem Eagle Minumun Essential Medium (EMEM), einem Zellkulturmedium (Fa. BioWhittaker, Verviers, Belgien), welchem 10%iges fetales Kälberserum (FKS) (Fa. Gibco BRL, Paisley, UK) zugesetzt wurde, erfolgte die regelmäßige Zellpassage in 2 Gewebekulturflaschen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland). Eine Passage konnte durchgeführt werden, wenn unter dem Mikroskop ein dicht bewachsener Zellrasen erkennbar war. Die Anzüchtung erfolgte bei 37°C im Inkubator (Fa. Haereus, Hanau, Deutschland) mit 5% CO₂.

24 h vor Versuchsbeginn wurden die Gewebekulturflaschen dem Inkubator entnommen, um unter dem Mikroskop die Bildung einer konfluenten Monolayer zu überprüfen. Anschließend mussten die Zellen einmalig mit 10 ml phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) gewaschen werden. Um die Zellen von der Oberfläche der Gewebekulturplatten abzulösen, wurden sie dann mit 1 ml einer 5%igen EDTA Trypsinlösung (Fa. BioChrom, Berlin, Deutschland) benetzt und die Flaschen für eine Einwirkzeit von 10 min zurück in den Inkubator gestellt.

Die darauf folgende Zugabe von 10 ml EMEM + FKS hob die Wirkung des Trypsins auf und die als weißer Schleier erkennbaren Zellen konnten zusammen mit dem Medium aus den Gewebekulturflaschen abgesaugt und in ein Becherglas gegeben werden. Hinzu mussten 62 ml frisches EMEM + FKS pipettiert werden, da für die eigentlichen Versuche eine Zellsuspensionsmenge von 72 ml benötigt wurde. Nach dem Durchmischen der Suspension schloss sich deren Verteilung auf drei 24-Well-Gewebekulturplatten (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) an, wobei pro Well 1 ml Zellsuspension pipettiert wurde. Abschließend kamen die drei Platten zur Anzüchtung eines Zellrasens innerhalb der Wells für 24 h in den Brutschrank.

4.2. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 stammen aus der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig, Deutschland. Sie wurden am Vortag auf Schaedler-Agar mit 8% Schafblut (Fa. Oxoid, Basingstoke, UK) frisch überimpft und zur Kultivierung in einen Inkubator mit 5% CO₂ gegeben, damit sie sich zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns in einer logarithmischen Wachstumsphase befanden. Bei *P. gingivalis* erfolgte die Anzüchtung anaerob mittels des Anaerogen®-Systems (Fa. Oxoid, Basingstoke, UK).

Einstellung der Bakteriendichte

Bei allen Versuchsansätzen wurden Bakteriensuspensionen mit einer Dichte von OD₆₄₀ = 0,1 verwendet, was einer Keimkonzentration von 10⁸ / ml entspricht. Der am Vortag frisch überimpfte Stamm des zu untersuchenden Erregers wurde dem Inkubator entnommen und mittels Wattestäbchen in ein dafür vorbereitetes, mit Eichmedium Medium 199 (Fa. Gibco BRL, Paisley, UK) gefülltes Röhrchen gegeben. Die Einstellung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 640 nm am Photometer. Nach Eichung des Geräts mit reinem Medium 199 wurde die erforderliche Dichte der Suspensionen in den Röhrchen durch Zugabe von Medium oder Bakterien eingestellt.

4.3. Antibiotika

Verwendet wurde das Fluorchinolon Moxifloxacin der Firma Bayer-Vital, Wuppertal, Deutschland.

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Mit Hilfe eines Etests® (Fa. AB BioDisk, Solna, Schweden) konnte für jeden Keim die minimale Hemmkonzentration gegenüber dem Antibiotikum Moxifloxacin ermittelt werden. Dabei wurde auf eine mit dem jeweiligen Bakterium beimpfte Schaedler-Agarplatte ein Eteststreifen aufgelegt. Dieser enthielt das Medikament Moxifloxacin. Die Platte wurde zwei Tage im CO₂-Inkubator (*A. actinomycetemcomitans* Y4) bzw. anaerob (*P. gingivalis* ATCC 33277) inkubiert. Danach konnte vom Eteststreifen die niedrigste Konzentration, bei der es nicht zum Wachstum des Keimes kam, als minimale Hemmkonzentration abgelesen werden (Abb. 2).

Bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 betrug dieser Wert 0,08 µg/ml und für *P. gingivalis* ATCC 33277 wurden 0,012 µg/ml ermittelt.

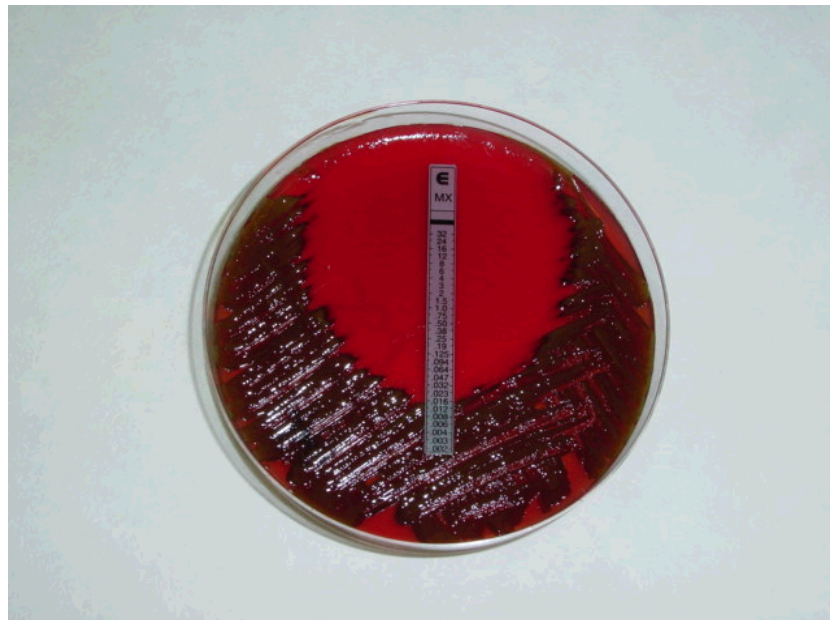


Abb. 2: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Moxifloxacin gegenüber *P. gingivalis* ATCC 33277

Ansetzen der Antibiotikallösungen

Der Versuchsablauf am folgenden Tag begann mit der Herstellung der benötigten Antibiotikallösungen (A I-IV). Neben der Kontrolllösung wurden Suspensionen mit drei verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen vorbereitet:

- A I: Kontrolle (ohne Antibiotikum)
- A II: 1/4 der MHK (0,003 µg/ml bei *P. gingivalis* ATCC 33277 und 0,02 µg/ml bei *A. actinomycetemcomitans* Y4)
- A III: 2,5 µg/ml – entspricht der wahrscheinlichen Konzentration des Antibiotikums im Gingivalsulkus bei systemischer Applikation
- A IV: 100 µg/ml – entspräche der Konzentration des Antibiotikums im Gingivalsulkus bei möglicher lokaler Applikation

4.4. Versuchsansatz III - Gleichzeitige Zugabe des Antibiotikums und des Bakterienstammes zu den KB-Zellen

Bei diesem Ansatz wurde der jeweils verwendete Bakterienstamm *A. actinomycetemcomitans* Y4 oder *P. gingivalis* ATCC 33277 den KB-Zellen zeitgleich mit dem Moxifloxacin zugegeben.

Vorbereitung der Antibiotikallösungen

Pro Antibiotikumkonzentration wurden in diesem Versuchsansatz jeweils 5,5 ml der Lösungen für die Kontrollen und 13,5 ml für die mit Moxifloxacin und dem Bakterienstamm versehenen Suspensionen benötigt. Die Herstellung der Antibiotikumsätze erfolgte stets mit leichtem Überschuss. Zunächst wurde eine Referenzlösung (A I), bestehend aus reinem Zellkulturmedium, vorbereitet. Anschließend wurde weiteres Zellkulturmedium EMEM mit den drei Moxifloxacinkonzentrationen versetzt (A II-IV).

A I:	20 ml EMEM	(ohne Antibiotikum)
A II:	20 ml EMEM	+ 1/4 MHK Moxifloxacin pro ml (A.a. Y4: + 0,02 µg/ml) (P.g. ATCC 33277: + 0,003 µg/ml)
A III:	20 ml EMEM	+ 2,5 µg Moxifloxacin pro ml
A IV:	20 ml EMEM	+ 100 µg Moxifloxacin pro ml

Vorbereitung der Bakteriensuspension

Bei diesem Versuchsansatz wurden 6 ml Bakteriensuspension mit einer Dichte von $OD_{640} = 0,1$ benötigt. Die Einstellung der Extinktion für den jeweiligen Keim erfolgte wie bereits beschrieben am Photometer.

Vorbereitung der Zellen

Die drei am Vortag angesetzten 24-Well-Gewebekulturplatten wurden aus dem Brutschrank entnommen, um unter dem Mikroskop die Bildung einer konfluenten Monolayer zu überprüfen. Das Waschen der Zellen unter der Laminarbox schloss sich an. Über eine Saugpumpe wurde das Nährmedium entfernt und mittels einer Perfusor-Spritze (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland) jedes Well mit 1 ml PBS versehen. Nach Absaugen des Spülmediums wiederholte sich dieser Vorgang ein zweites Mal.

Befüllen der Gewebekulturplatten

Die vier hergestellten Ansätze der Antibiotikallösungen wurden nun aufgeteilt. 5,5 ml aus jedem Ansatz wurden mit je 0,5 ml PBS versetzt und dienten als Kontrolllösungen (K I-IV) in den Spalten 1 und 2 auf der Gewebekulturplatte.

Zur Herstellung der Bakteriensuspensionen (BS I-IV) wurden pro Ansatz weitere 13,5 ml Lösung entnommen und in 4 sterile Bechergläser gefüllt. In jedes wurden daraufhin 1,5 ml der vorbereiteten Bakteriensuspension zugegeben. Nach dem separaten Durchmischen der einzelnen Proben konnten nun alle drei Platten nach dem gleichen Pipettierschema mit je 1 ml Kontrolllösung oder Bakteriensuspension pro Well befüllt werden (Abb. 3).

	1	2	3	4	5	6
I	K I	K I	BS I	BS I	BS I	BS I
II	K II	K II	BS II	BS II	BS II	BS II
III	K III	K III	BS III	BS III	BS III	BS III
IV	K IV	K IV	BS IV	BS IV	BS IV	BS IV

Abb. 3: Pipettierschema der Kontrolllösungen (K I-IV) und der Bakteriensuspensionen (BS I-IV) bei gleichzeitiger Zugabe des Antibiotikums und der Bakterien zu den KB-Zellen

Anschließend kamen die Gewebekulturplatten zurück in den Brutschrank. Nach einer, sechs und achtzehn Stunden wurden sie weiter bearbeitet.

4.5. Bestimmung der Zahl der freien, adhärennten und internalisierten Bakterien sowie Entnahme von Zellkulturüberständen

Wurden die Gewebekulturplatten nach den jeweiligen Inkubationszeiten dem Brutschrank wieder entnommen, erfolgte die Weiterbearbeitung stets nach dem gleichen Ablaufschema, sodass dieser Teil für alle Versuchsansätze zusammengefasst beschrieben werden kann.

Bestimmung der freien Bakterien

Zur Bestimmung der nicht adhärennten Bakterien nach 6 h und 8 h mussten den Spalten 3 bis 6 sofort nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit vor Zugabe weiterer Lösungen zusätzliche Proben entnommen werden. Dabei wurden aus den zwei benachbarten Spalten einer Reihe jeweils 5 µl Suspension pipettiert, diese 10 µl dann mit 990 PBS verdünnt und von dieser Menge je 100 µl auf acht frische Schaedler-Agarplatten ausgespatelt. Alle Platten kamen dann für eine Woche bei 37°C in den Brutschrank, wobei *P. gingivalis* anaerob inkubiert werden musste. Nach Ablauf dieser Zeit konnten die Zahlen der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) als Maß für die freien Bakterien durch Auszählen ermittelt werden.

Gewinnung der Zytokine

Nach abgeschlossener Probenentnahme für die Bestimmung der freien Bakterien wurden den zwei jeweils nebeneinander liegenden Wells, oben links auf der Gewebekulturplatte beginnend, waagerecht jeweils 800 µl der Proben entnommen und zusammen in je ein Eppendorftube pipettiert. Die zwölf auf diese Weise mit einer Suspensionsmenge von je 1600 µl befüllten Tubes wurden daraufhin für 10 min bei 14 000/min zentrifugiert. Dieser Schritt war erforderlich, um möglichst wenig Bakterien und KB-Zellen in den Proben zu behalten. Anschließend folgte die zweimalige Entnahme von 700 µl aus jedem Tube. Diese Proben wurden sofort bei -20°C in Cryoröhrchen eingefroren. Pro Gewebekulturplatte konnten somit 24 Proben zur späteren Auswertung der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α und TGF-β1 mittels ELISA-Test gewonnen werden.

Weiterbearbeitung der Gewebekulturplatten

Ziel dieses Arbeitsschrittes war die Bestimmung der adhärenenten und invasiven Bakterien. Zunächst mussten zwei sterile Bechergläser wie folgt befüllt werden: Ein Becherglas enthielt 20 ml Aqua dest., das zweite Glas 25 ml EMEM + 250 µg Metronidazol (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland) zum Abtöten der extrazellulären Erreger. Die Gewebekulturplatten wurden dann einmalig mit der Spüllösung PBS gewaschen. Die bereit gestellten Substanzen kamen anschließend folgendermaßen auf die Platten: Die Wells der Spalten 3 und 5 wurden je mit 1 ml kaltem Aqua dest. befüllt, die Spalten 4 und 6 mit je 1 ml der Metronidazolösung. Die Platten wurden zurück in den Brutschrank gestellt. Die Weiterbearbeitung begann für die Spalten 3 und 5 zur Bestimmung der adhärenenten Mikroorganismen nach 15 min Einwirkzeit, für die Spalten 4 und 6 zur Bestimmung der invasiven Bakterien nach 45 min.

Bestimmung der adhärenenten Bakterien

Nach mehrfachem Durchmischen der zu untersuchenden Proben innerhalb der einzelnen Wells wurde jedem Well der Spalten 3 und 5 jeweils 10 µl Suspension entnommen und diese Flüssigkeitsmenge separat auf acht dafür vorbereitete und beschriftete Schaedler-Agarplatten ausgespatelt. Die Platten wurden aerob bzw. mikroaerophil bei 37°C bebrütet und nach 7 d konnten die Zahlen der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) als Maß für die adhärenenten Bakterien ermittelt werden.

Bestimmung der internalisierten Bakterien

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 45 min wurden die Wells der Spalten 4 und 6 mit je 1 ml PBS gespült und anschließend mit je 1 ml kaltem Aqua dest. befüllt. Dieses musste 10 min einwirken und führte zum Zerplatzen der KB-Zellen und folglich zum Freiwerden der internalisierten Bakterien. Dann wurden die Suspensionen innerhalb der Wells separat durchmischt und jeweils eine Menge von 100 µl pro Well auf acht dafür bereit gestellte Schaedler-Agarplatten ausgespatelt. Die Zahl der internalisierten Mikroorganismen (KBE) konnte nach wiederum 7 d Inkubation ermittelt werden.

4.6. Nachweis der Zytokine

Die Ermittlung der freigesetzten Zytokine erfolgte mit den Testkits Human IL CytoSets™ der Firma Biosource, Ratingen, Deutschland. Es handelt sich dabei um ein konventionelles Sandwich-Enzym-Immunassay, das nach folgendem Prinzip funktioniert:

Die Oberfläche der verwendeten Polystyrol-Mikrotiterplatte wird mit einem Coating-Antikörper beschichtet. Zudem wird ein Detection-Antikörper, der mit einem Enzym markiert ist, zugesetzt. Als Standardkurve wird eine Verdünnungsreihe mit bekannter Antigenkonzentration mitgeführt. Sind Antigene (hier: Zytokine) vorhanden, können diese und dadurch der mit dem Enzym markierte Detection-Antikörper an die Oberfläche binden. Nach Auswaschen aller ungebundenen Reaktanten ist ein Farbumschlag messbar. Dieser kommt zustande, indem das Enzym ein zugefügtes Substrat umsetzt und durch Zugabe von Säure ein optisch erkennbares, gelbes Produkt entsteht. Diese Gelbfärbung ist umso intensiver, je höher die Antigenkonzentration in der Probe ist.

Die genaue Menge der in der jeweiligen Lösung befindlichen Zytokine wurde dann mit Hilfe von Standardkurven berechnet. Dazu wurde der ELISA-Reader (Spectra Rainbow, TECAN, Crailsheim, Deutschland) verwendet. Bei 450 nm erfolgte die Messung der Farbintensität für den Standard und die Proben. Mit Hilfe des zugehörigen Programms wurde die optische Dichte des Standards (Ordinate) gegen die Konzentration des Standards (Abszisse) aufgezeichnet und so eine Standardkurve berechnet. Aus dieser konnte dann die Konzentration jeder einzelnen Probe abgelesen werden.

4.7. Versuchsansatz I - Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Ziel dieses Aufbaus war es, die KB-Zellen für eine Stunde mit dem Antibiotikum zu inkubieren, bevor die Bakteriensuspension hinzugefügt werden sollte.

Vorbereitung der Antibiotikallösungen

Zunächst wurden die für diesen Versuchsaufbau benötigten Moxifloxacinansätze (A I-IV) hergestellt:

A I:	20 ml EMEM	(ohne Antibiotikum)
A II:	20 ml EMEM	+ 1/4 MHK Moxifloxacin pro ml (A.a. Y4: + 0,02 µg/ml) (P.g. ATCC 33277: + 0,003 µg/ml)
A III:	20 ml EMEM	+ 2,5 µg Moxifloxacin pro ml
A IV:	20 ml EMEM	+ 100 µg Moxifloxacin pro ml

Vorbereitung der Zellen

Der Vorbereitungsschritt in diesem Aufbau glich dem in Versuchsansatz III und wurde dort bereits beschrieben.

Befüllen der Gewebekulturplatten

Die KB-Zellen in den drei 24-Well-Gewebekulturplatten wurden nun mit je 1 ml der hergestellten Antibiotikallösungen I-IV versetzt. Dabei wurde stets Ansatz I in Reihe I, Ansatz II in Reihe II usw. pipettiert. Alle drei Platten kamen daraufhin zur Vorinkubation des Antibiotikums mit den Zellen für eine Stunde in den CO₂-Schränk.

Vorbereitung der Bakterienlösung

Für diesen Versuchsaufbau wurden 5 ml Bakteriensuspension OD₆₄₀ = 0,1 benötigt. Die Herstellung wurde bereits erklärt.

Vorbereitung der Zellen

Nach einer Stunde wurden die Gewebekulturplatten aus dem Inkubator entnommen und wie oben beschrieben erneut mit der Spüllösung PBS gereinigt.

Erneutes Befüllen der Gewebekulturplatten

Die 5 ml der vorbereiteten Bakteriensuspension wurden nun zu 45 ml frischem EMEM in ein Becherglas gegeben. Das Durchmischen der Probe schloss sich an. Als Kontrolllösung dienten 22,5 ml EMEM + 2,5 ml PBS. Die mit dem Antibiotikum vorinkubierten Zellen konnten nun mit je 1 ml der Kontrolllösung K bzw. der Bakteriensuspension BS nach folgendem Schema versetzt werden (Abb. 4):

	1	2	3	4	5	6
I	K	K	BS	BS	BS	BS
II	K	K	BS	BS	BS	BS
III	K	K	BS	BS	BS	BS
IV	K	K	BS	BS	BS	BS

Abb. 4: Pipettierschema der Kontrolllösung (K) und der Bakteriensuspension (BS) bei Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Anschließend kamen die Gewebekulturplatten zurück in den Brutschrank. Nach 1 h, 6 h und 18 h wurden sie wie bereits beschrieben bearbeitet.

4.8. Versuchsansatz II - Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin

Bei diesem Versuchsaufbau wurden die jeweils zu untersuchenden Bakterien (*A. actinomycetemcomitans* Y4 oder *P. gingivalis* ATCC 33277) mit dem Antibiotikum für 1 h vorinkubiert.

Vorbereitung der Antibiotikallösungen

Die Inkubation der Bakterien mit dem Moxifloxacin fand in vier Eppendorftubes mit einem Fassungsvermögen von je 2 ml statt. Die Ansätze der Antibiotikallösungen konnten daher auf die Menge von 1/10 reduziert werden:

A I:	2 ml EMEM	(ohne Antibiotikum)
A II:	2 ml EMEM	+ 1/4 MHK Moxifloxacin pro ml (A.a. Y4: + 0,02 µg/ml) (P.g. ATCC 33277: + 0,003 µg/ml)
A III:	2 ml EMEM	+ 2,5 µg Moxifloxacin pro ml
A IV:	2 ml EMEM	+ 100 µg Moxifloxacin pro ml

Der am Vortag frisch überimpfte Bakterienstamm wurde dem Inkubator entnommen. In die mit den Antibiotikallösungen versehenen Tubes I-IV wurden dann mit sterilen Wattestäbchen so hohe Keimmengen hinzugegeben, dass durch keines der Röhrchen mehr hindurch gesehen werden konnte (MacFarland Standard 4). Daraufhin kamen die verschlossenen Tubes zur Vorinkubation für eine Stunde in den Brutschrank.

Vorbereitung der Bakteriensuspensionen

Nach dieser Stunde mussten die Proben dem Brutschrank entnommen und sofort für 10 min bei 14 000/min zentrifugiert werden. Der gesamte Überstand wurde daraufhin abgesaugt und die am Boden der Tubes befindlichen Bakterien mit 1 ml PBS gespült. Erneutes Zentrifugieren für 5 min bei 14 000/min schloss sich an. Sämtliches PBS wurde wieder abgesaugt und pro Tube nun 1 ml Medium 199 hinzugegeben. Parallel mussten fünf 5 ml Röhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) mit Medium 199 gefüllt und beschriftet werden. Die Röhrchen I-IV sollten nach der photometrischen Extinktionsbestimmung 1,5 ml

der Bakteriensuspensionen BS I-IV enthalten, Röhrchen 5 diente als Kontrollmedium beim Eichvorgang und beim Einstellen der Dichte auf $OD_{640} = 0,1$. Mit allen 9 Röhrchen erfolgte nun die Einstellung der Extinktion der vier Proben am Photometer bei 640 nm, wie es in Versuchsansatz III erklärt wurde.

Vorbereitung der Zellen

Der Ablauf der Vorbereitung der Zellen glich dem der Beschreibung in Versuchsansatz III.

Befüllen der Gewebekulturplatten

Die 1,5 ml der vorbereiteten Bakteriensuspensionen I-IV mussten nun zu je 13,5 ml frischem Zellkulturmedium EMEM gegeben werden. Als Kontrolllösung wurden 5,5 ml EMEM mit 0,5 ml PBS versetzt. Nach dem separaten Durchmischen der einzelnen Bakteriensuspensionen konnten diese gemeinsam mit der Kontrolllösung nach folgendem Schema mit 1 ml pro Well auf die drei Gewebekulturplatten verteilt werden (Abb. 5):

	1	2	3	4	5	6
I	K	K	BS I	BS I	BS I	BS I
II			BS II	BS II	BS II	BS II
III			BS III	BS III	BS III	BS III
IV			BS IV	BS IV	BS IV	BS IV

Abb. 5: Pipettierschema der Kontrolllösung (K) und der Bakteriensuspensionen (BS I-IV) bei Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin

Die Gewebekulturplatten kamen zurück in den Brutschrank und nach 1 h, 6 h und 18 h begann die bereits beschriebene Weiterbearbeitung.

5. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Resultate der Bestimmungen der adhären, invasiven und freien Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 zusammengefasst und erläutert. Zudem folgt die Darstellung der Werte der Interleukinmessung.

5.1. Freie Bakterien

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind tendenziell einheitlich. Sowohl bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 als auch bei *P. gingivalis* ATCC 33277 haben mit einer Ausnahme alle drei Versuchsansätze gezeigt, dass die Anzahl der freien Mikroorganismen unter Zugabe von Moxifloxacin konzentrationsabhängig verringert werden konnte. Nach 18 h waren die Resultate am deutlichsten.

Ansatz I - Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Die Vorbehandlung der Zellen mit dem Antibiotikum zeigte Wirkung auf beide Bakterienstämme, vor allem bei Applikation der höchsten Konzentration. Nach 6 h und der Zugabe von 100 µg/ml Moxifloxacin wurden 349500 KBE von *A. actinomycetemcomitans* Y4 gezählt, was einer Reduktion auf 63,7% entspricht. Nach 18 h konnte sogar eine Verminderung auf 0,4% festgestellt werden. Geringere Mengen Moxifloxacin minimierten die Zahlen der freien *A. actinomycetemcomitans* Y4 nur leicht.

Die Werte der freien *P. gingivalis* ATCC 33277 sanken nach 6 h bei höchster Konzentration auf 60,1%, nach 18 h allerdings nur noch auf 85,8%. Die niedrigeren Dosierungen hatten nach 18 h keinen antibakteriellen Effekt, es kam sogar zu einer Zunahme der Erregerzahlen um 43,4% (Abb. 6).

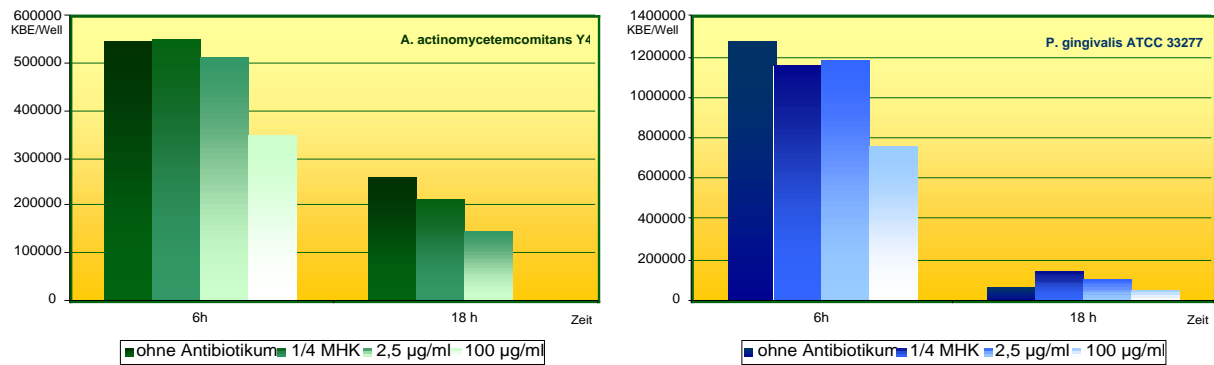


Abb. 6: Zahlen freier *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Ansatz II - Vorinkubation der Bakterien mit dem Antibiotikum

Nach Vorinkubation der Mikroorganismen mit dem Antibiotikum wurde bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 im Vergleich zu den anderen Versuchsansätzen die geringste Abnahme der Erregerzahl festgestellt. 100 µg/ml Moxifloxacin bewirkten nach 18 h Inkubationszeit lediglich eine Senkung um 57,5%.

P. gingivalis ATCC 33277 zeigte nach 6 h eine deutliche Keimreduktion bei allen zugegebenen Konzentrationen. So sanken die Werte auf 38,3% (1/4 MHK), 12,5% (2,5 µg/ml) und 31,9% (100 µg/ml). Nach 18 h konnte jedoch trotz 100 µg/ml Moxifloxacin kein antibakterieller Effekt nachgewiesen werden (Abb. 7).

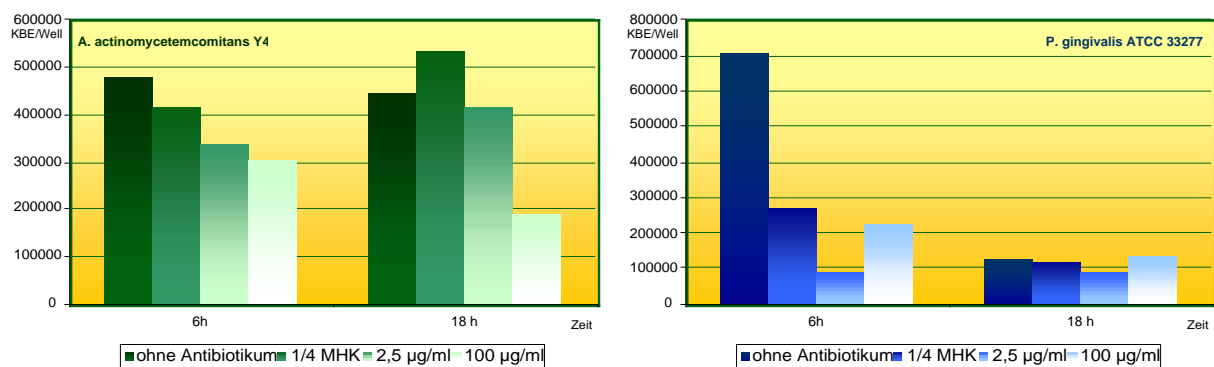


Abb. 7: Zahlen freier *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin

Ansatz III – Gleichzeitige Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

Bereits die geringeren Konzentrationen 1/4 MHK bzw. 2,5 µg/ml minimierten nach 18 h Inkubationszeit die Zahlen der freien Bakterien bei diesem Ansatz um 98,4% bzw. 99,7% (*A. actinomycetemcomitans* Y4) und um 93,3% bzw. 99,5% (*P. gingivalis* ATCC 33277). Nach 18 h konnten die freien *P. gingivalis* ATCC 33277 mit einer Moxifloxacinkonzentration von 100 µg/ml auf bis zu 0,5% reduziert werden. Bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 kam es bei gleicher Menge Antibiotikum in dieser Zeit zur vollständigen Keimeliminierung (Abb. 8).

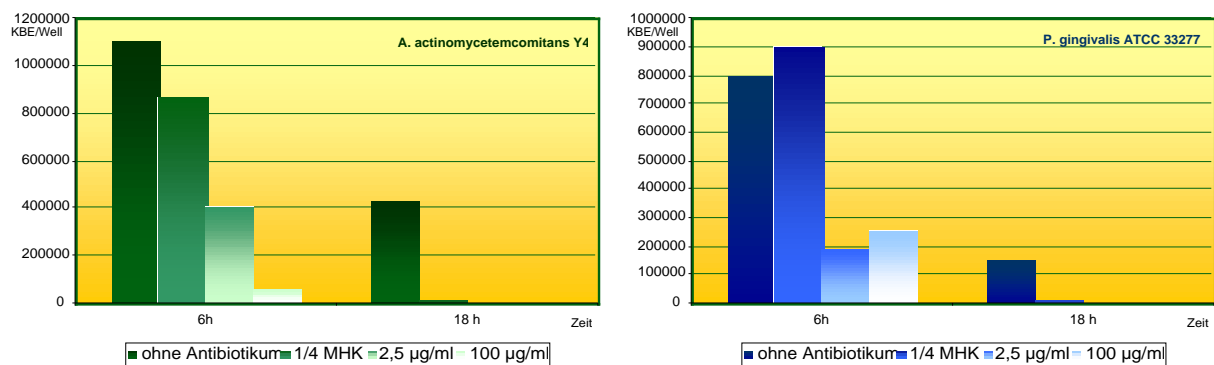


Abb. 8: Zahlen freier *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

5.2. Adhärente Bakterien

Die Wirkung des Antibiotikums auf die Zahl der adhärenenten Mikroorganismen war stark vom Versuchsaufbau, der Inkubationszeit und den zugegebenen Moxifloxacinkonzentrationen abhängig.

Ansatz I - Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Nach einstündiger Inkubationszeit war bei beiden Stämmen keine antibakterielle Wirkung des Antibiotikums nachweisbar. Auch nach 6 h wurde nur bei einer Moxifloxacinkonzentration von 100 µg/ml eine Abnahme der adhärenenten *P. gingivalis* ATCC 33277 um 11,5% festgestellt. Bei niedrigeren Konzentrationen kam es teilweise zu einem Zuwachs von bis zu 20,7% (*P. gingivalis* ATCC 33277) und 26,3% (*A. actinomycetemcomitans* Y4). Ähnliche Ergebnisse waren bei den 18 h Versuchen zu verzeichnen. Die Bakterienzahl stieg um bis zu

66% an, nur bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 konnte mit einer Konzentration von 100 µg/ml eine Reduktion dieses Stammes auf 1,5% bewirkt werden (Abb. 9).

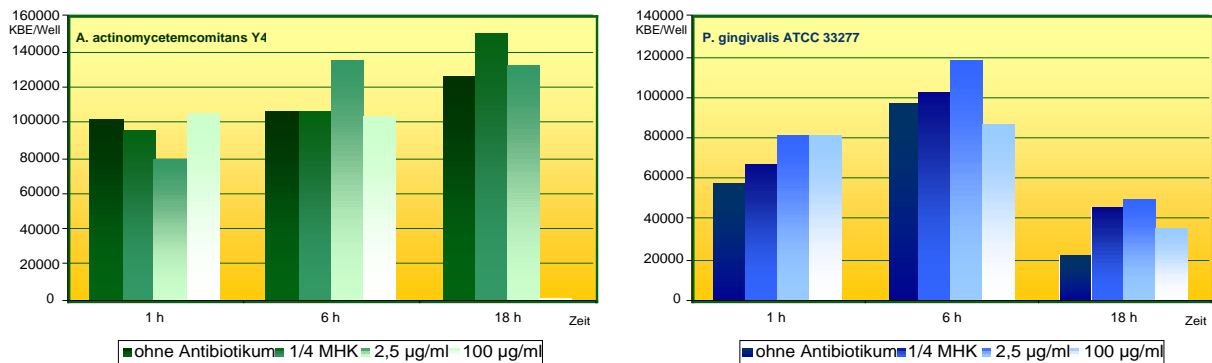


Abb. 9: Zahlen adhärenter *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Ansatz II - Vorinkubation der Bakterien mit dem Antibiotikum

Bei diesem Versuchsansatz konnte dem Antibiotikum gegenüber *A. actinomycetemcomitans* Y4 keine antibakterielle Wirksamkeit zugeschrieben werden. Zu allen Zeitpunkten und bei allen Konzentrationen stiegen die Zahlen der adhärenenten Keime an. Selbst bei 100 µg/ml Moxifloxacin wurden Werte von 141500 KBE/Well (6 h) bzw. 169000 KBE/Well (18 h) erreicht, was einer Zunahme um 25% (6 h) bzw. 20,7% (18 h) entspricht. Auch bei *P. gingivalis* ATCC 33277 konnte eine Reduktion der Erreger nur bei der höchsten Antibiotikumkonzentration nachgewiesen werden. So sank die Zahl der KBE nach 18 h um 13,3%. Bei den niedrigeren Konzentrationen mussten nach 18 h Zunahmen von 31,2% (1/4 MHK) und 16,6% (2,5 µg/ml) notiert werden (Abb. 10).

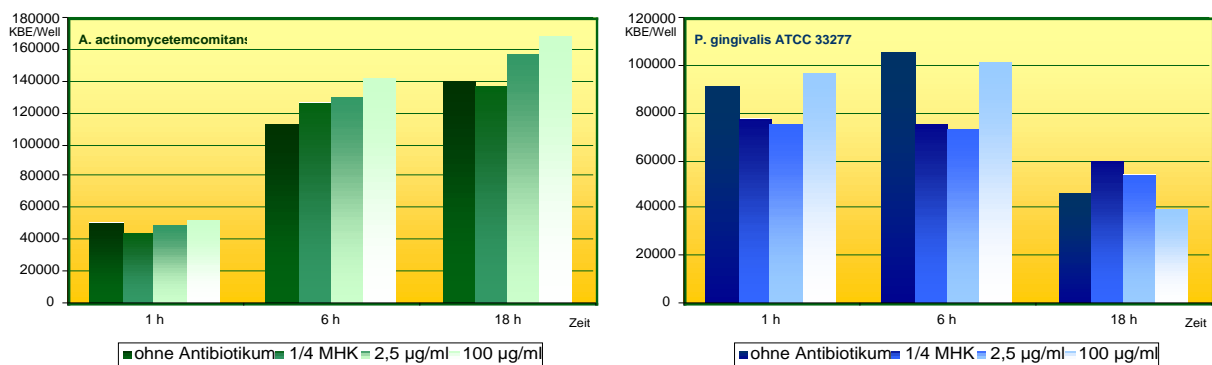


Abb. 10: Zahlen adhärenter *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin

Ansatz III – Zeitgleiche Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

Bei Zugabe des Antibiotikums zum Zeitpunkt der Infektion und somit auch längerer Einwirkzeit konnten bei beiden Stämmen antibakterielle Effekte auf die Zahlen der adhärenenten Bakterien nachgewiesen werden. Bereits nach einstündiger Inkubationszeit war eine Reduktion der Mikroorganismen bei allen Konzentrationen erkennbar. Dieses Ergebnis wurde nach 6 h noch deutlicher, so sank die Menge adhärenenten *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei 1/4 MHK bereits auf 67,3%, bei 2,5 µg/ml auf 44,6% und bei 100 µg/ml Moxifloxacin auf 9,7%. Für *P. gingivalis* ATCC 33277 wurden die Werte 69,3% (1/4 MHK), 45,5% (2,5 µg/ml) und 39,1% (100 µg/ml) notiert. Nach 18 h konnte bei höchster Konzentration sogar eine Verringerung der adhärenenten Bakterien auf 0,07% (*A. actinomycetemcomitans* Y4) bzw. 1% (*P. gingivalis* ATCC 33277) festgestellt werden (Abb. 11).

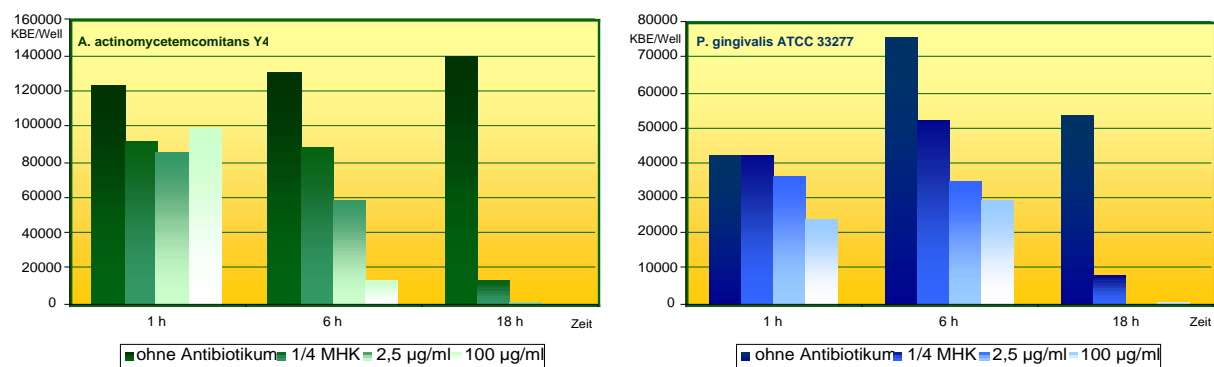


Abb. 11: Zahlen adhärenenten *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

5.3. Invasive Bakterien

Der Einfluss des Antibiotikums auf die Invasion war bei beiden Bakterienstämmen stark abhängig vom Versuchsansatz, der Menge des zugegebenen Moxifloxacin und der Zeitdauer der Inkubation.

Ansatz I - Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Nach 1 h und 6 h konnten sowohl bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 als auch bei *P. gingivalis* ATCC 33277 unabhängig von der zugegebenen Menge Moxifloxacin keine Effekte des Antibiotikums auf die Invasion beobachtet werden. Erst nach 18 h Inkubationszeit und

nur bei einer Konzentration von 100 µg/ml kam es bei beiden Kulturen zu einer deutlichen Verringerung der Mikroorganismen. Die Werte sanken bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 auf 3050 KBE, was einer Reduktion auf 2,6% entspricht. Für *P. gingivalis* ATCC 33277 wurden 250 KBE (14,3%) gezählt (Abb. 12).

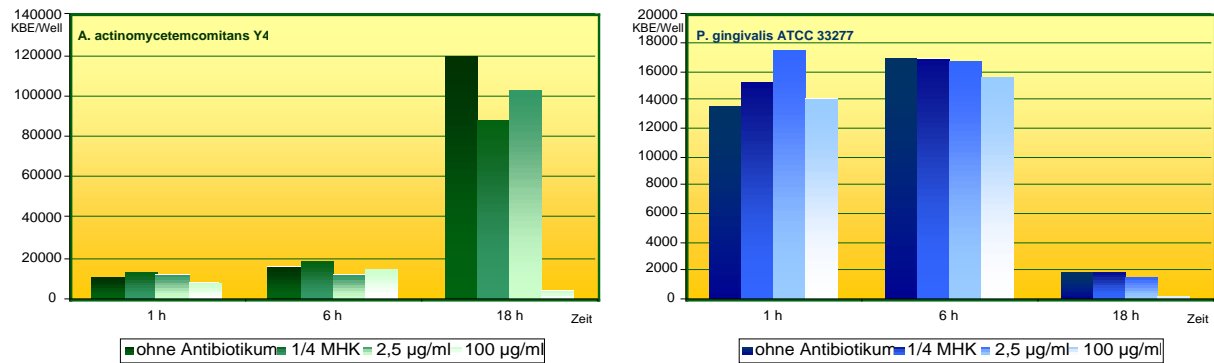


Abb. 12: Zahlen invasiver *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Ansatz II - Vorinkubation der Bakterien mit dem Antibiotikum

In diesem Versuchsansatz konnte das Antibiotikum gegenüber *A. actinomycetemcomitans* Y4 zu keiner Zeit und mit keiner der angesetzten Konzentrationen antibakteriell wirksam werden. So stiegen die Zahlen der invasiven Mikroorganismen nach 6 h um bis zu 33,5% (2,5 µg/ml) bzw. 24% (100 µg/ml), nach 18 h wurden bei den gleichen Konzentrationen Zunahmen um 22,3% bzw. 44,2% registriert.

Bei *P. gingivalis* ATCC 33277 hingegen kam es nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten bei allen Moxifloxacinkonzentrationen zu deutlichen Verringerungen der Mikroorganismen auf bis zu 21,7% (Abb. 13).

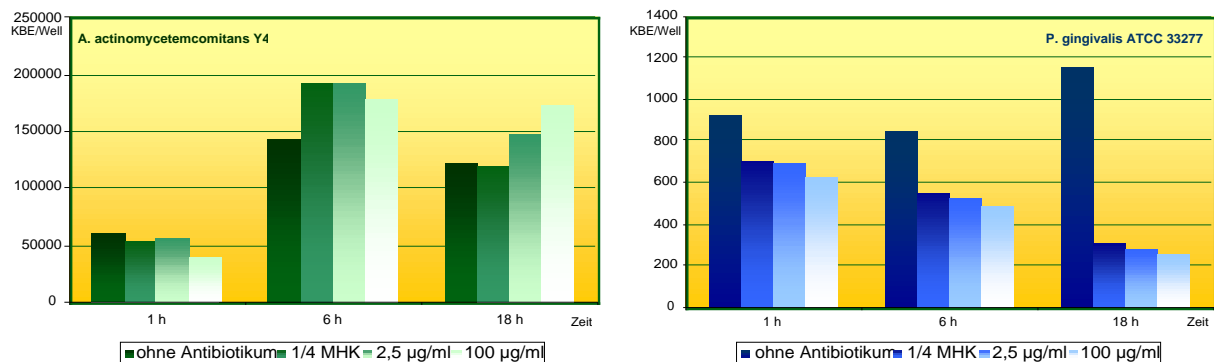


Abb. 13: Zahlen invasiver *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin

Ansatz III – Gleichzeitige Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

Das gleichzeitige Zugeben von Bakterien und Antibiotikum zu den Zellen erzielte bei beiden Stämmen einen deutlichen Effekt auf die Zahl der intrazellulären Erreger. So sanken die Werte invasiver *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei 2,5 µg/ml Moxifloxacin auf 89,7% (6 h) bzw. auf 0,7% (18 h) und bei höchster Konzentration auf 57,2% (6 h) bzw. 0,3% (18 h). Für *P. gingivalis* ATCC 33277 konnten ebenso markante Ergebnisse notiert werden. Nach 18 h bei 2,5 µg/ml wurden 100 KBE gezählt, was einer Reduktion um 95,2% entspricht. 100 µg/ml Moxifloxacin bewirkten in dieser Zeit sogar eine vollständige Eliminierung der Mikroorganismen (Abb. 14).

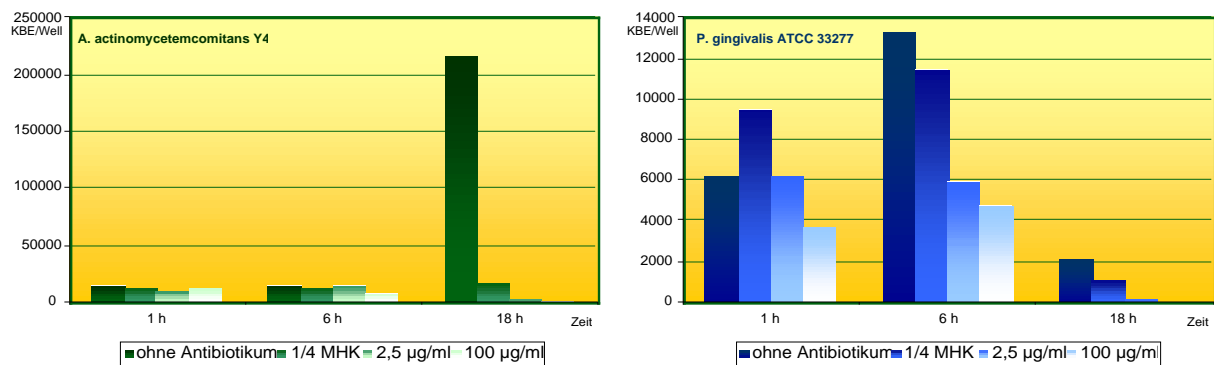


Abb. 14: Zahlen invasiver *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

5.4. Freisetzung der Zytokine

Die Freisetzungen von IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und TGF- β 1 wurden mit Hilfe eines konventionellen Sandwich-Enzym-Immunassays (ELISA-Test) ermittelt.

Interleukin-1 β

Sowohl nach Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277, als auch bei den nicht infizierten Zellen konnte, unabhängig vom Versuchsansatz, innerhalb von 18 h keine Freisetzung von IL-1 β aus den KB-Zellen festgestellt werden. Alle Ergebnisse lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 2 pg/ml.

Tumornekrosefaktor- α

In der Auswertung der drei Versuchsansätze mittels ELISA-Test konnte weder bei den untersuchten Mikroorganismen noch bei den nicht infizierten Zellen eine TNF- α -Sezernierung aus den Epithelzellen registriert werden. Die Nachweisgrenze von 2 pg/ml wurde zu keinem Zeitpunkt erreicht.

Interleukin-6

Nach einstündiger Vorinkubation der Bakterien bzw. der KB-Zellen mit Moxifloxacin konnte innerhalb der Untersuchungszeiträume weder bei *P. gingivalis* ATCC 33277 noch bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 eine IL-6-Freisetzung aus den Epithelzellen festgestellt werden. Die Nachweisgrenze von 2 pg/ml wurde auch bei den nicht infizierten Zellen nicht überschritten.

Bei gleichzeitiger Zugabe der Mikroorganismen und des Antibiotikums zu den Zellen hingegen konnte bei beiden Stämmen eine geringe, moxifloxacinabhängige Sezernierung des Zytokins nachgewiesen werden. Bei den nicht infizierten Zellen stiegen die IL-6-Werte bei 100 µg/ml Moxifloxacin bis auf 21 pg/ml an (Abb. 15).

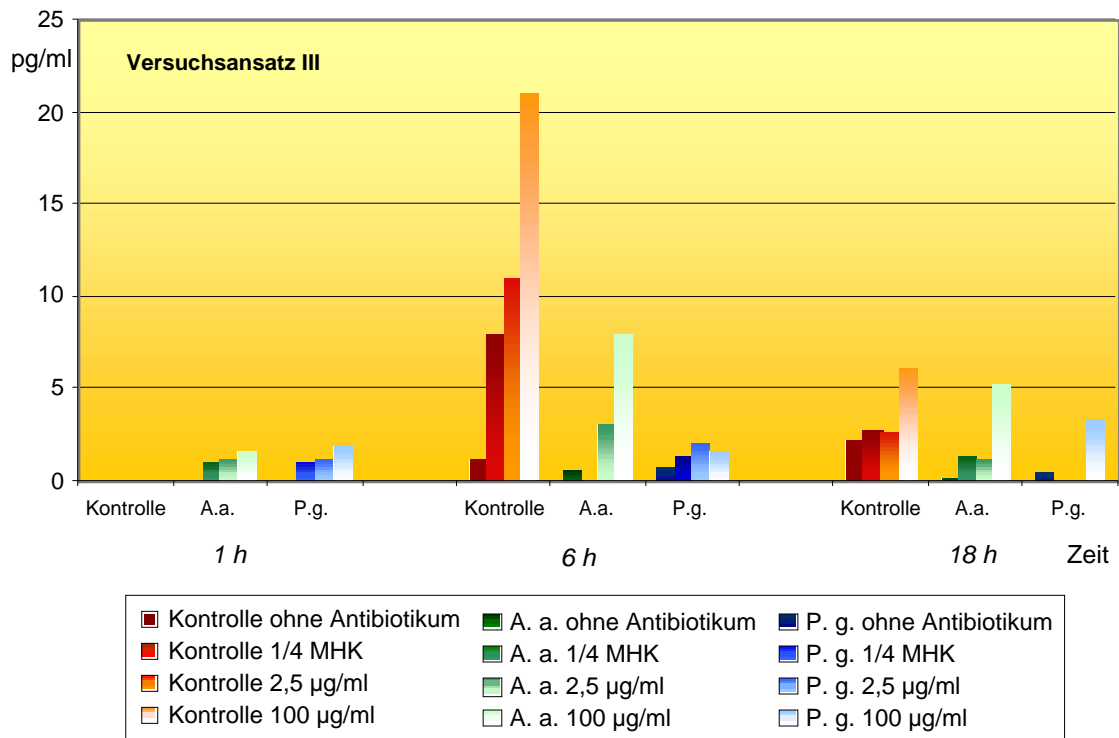


Abb. 15: Freisetzung von IL-6 bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

Interleukin-8

Die vorliegenden Ergebnisse differieren sehr stark. Nach Infektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 konnte zu keinem Zeitpunkt bei einem der drei Versuchsansätze eine Sezernierung des Zytokins aus den KB-Zellen beobachtet werden.

Die IL-8-Freisetzung der mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 inkubierten Zellen war hingegen genau wie bei den nicht infizierten Zellen bei allen Versuchsansätzen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und den zugegebenen Antibiotikumkonzentrationen erhöht.

Ansatz I - Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Nach Vorinkubation der KB-Zellen mit dem Antibiotikum wurden folgende Ergebnisse ermittelt: die IL-8-Freisetzung stieg bei den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierten Zellen nach 6 h bei einer Konzentration von 1/4 MHK auf das 2,9 fache, bei 2,5 µg/ml Moxifloxacin auf das 2,5 fache und bei 100 µg/ml auf das 1,4 fache an. Nach 18 h ist deutlich erkennbar, dass die Menge des sezernierten IL-8 direkt mit den zugegebenen Antibiotikumkonzentrationen korreliert. So wurde bei Zugabe der höchsten Konzentration nach Ablauf der 18 h ein IL-8-Zuwachs auf das 1,4 fache notiert. Auch bei den nicht infizierten Zellen konnten ähnliche Ergebnisse festgehalten werden. Ohne Zugabe von Moxifloxacin setzten diese KB-Zellen nach 18 h bereits 74 pg/ml IL-8 frei. Bei 100 µg/ml Antibiotikum und gleicher Inkubationszeit stieg der Wert der freigesetzten Zytokine auf das 1,3 fache an (Abb. 16).

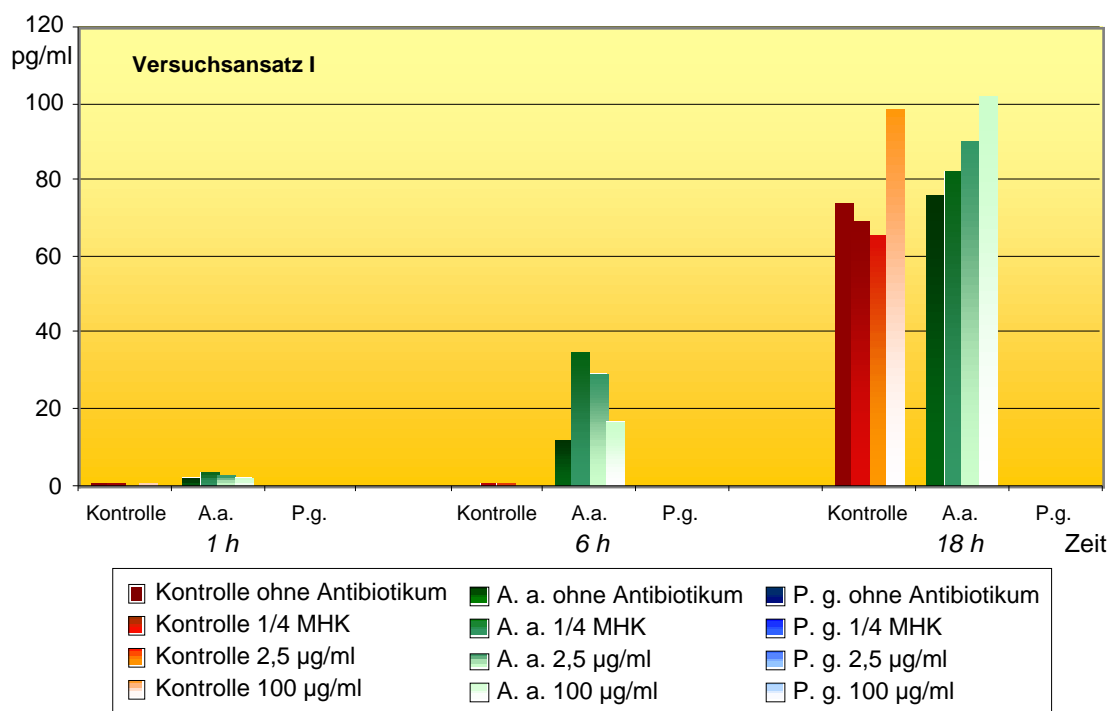


Abb. 16: Freisetzung von IL-8 nach Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Ansatz II - Vorinkubation der Bakterien mit dem Antibiotikum

Auch nach Vorinkubation der Bakterien mit dem Antibiotikum kam es bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 zu einer erhöhten, moxifloxacinabhängigen IL-8-Sezernierung. Die Zytokinwerte stiegen nach Ablauf der 18 h Inkubationszeit auf das 1,2 fache bei 2,5 µg/ml Moxifloxacin und auf das 1,7 fache bei 100 µg/ml. Je mehr Antibiotikum zugegeben wurde, desto größer war die IL-8-Freisetzung. Auch die nicht infizierten Zellen sezernierten das Zytokin (Abb. 17).

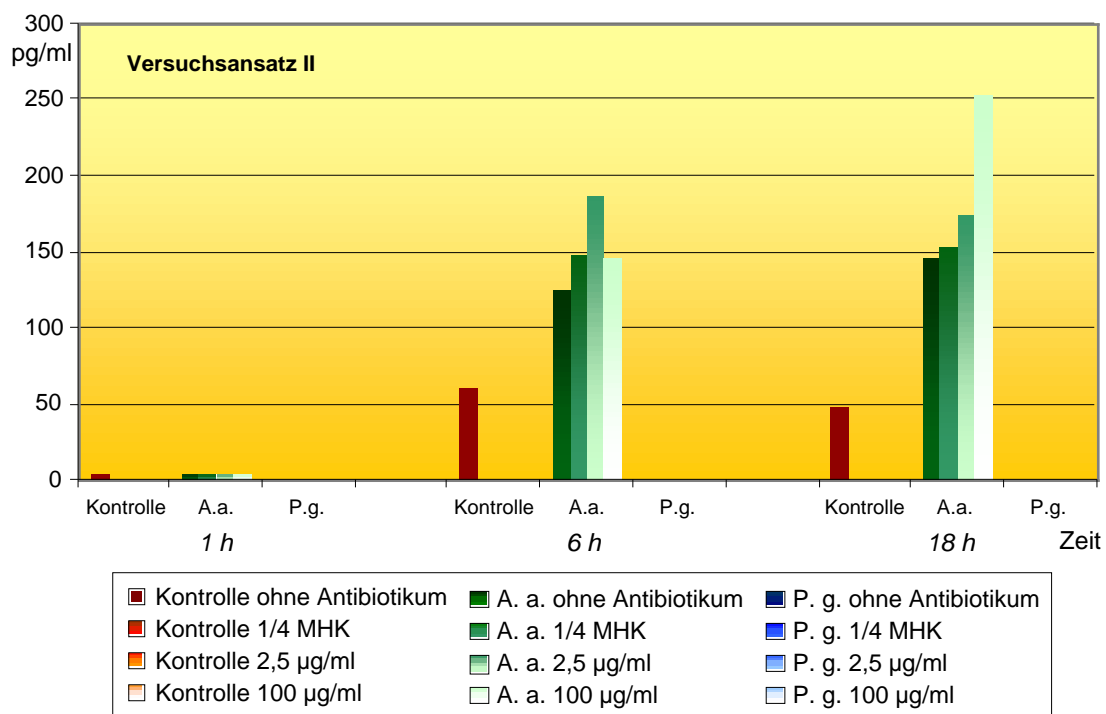


Abb. 17: Freisetzung von IL-8 aus den KB-Zellen bei Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin

Ansatz III – Gleichzeitige Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

Die deutlichsten Ergebnisse konnten bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen erfasst werden. Bereits nach 6 h ist erkennbar, dass die IL-8-Freisetzung sowohl bei den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 inkubierten Zellen als auch bei den nicht infizierten Zellen in Abhängigkeit von den zugegebenen Antibiotikumkonzentrationen erhöht ist. Die IL-8-Werte stiegen bei Zugabe von 100 µg/ml Moxifloxacin auf das 16 fache (6 h) und das 6 fache (18 h) an (Abb. 18).

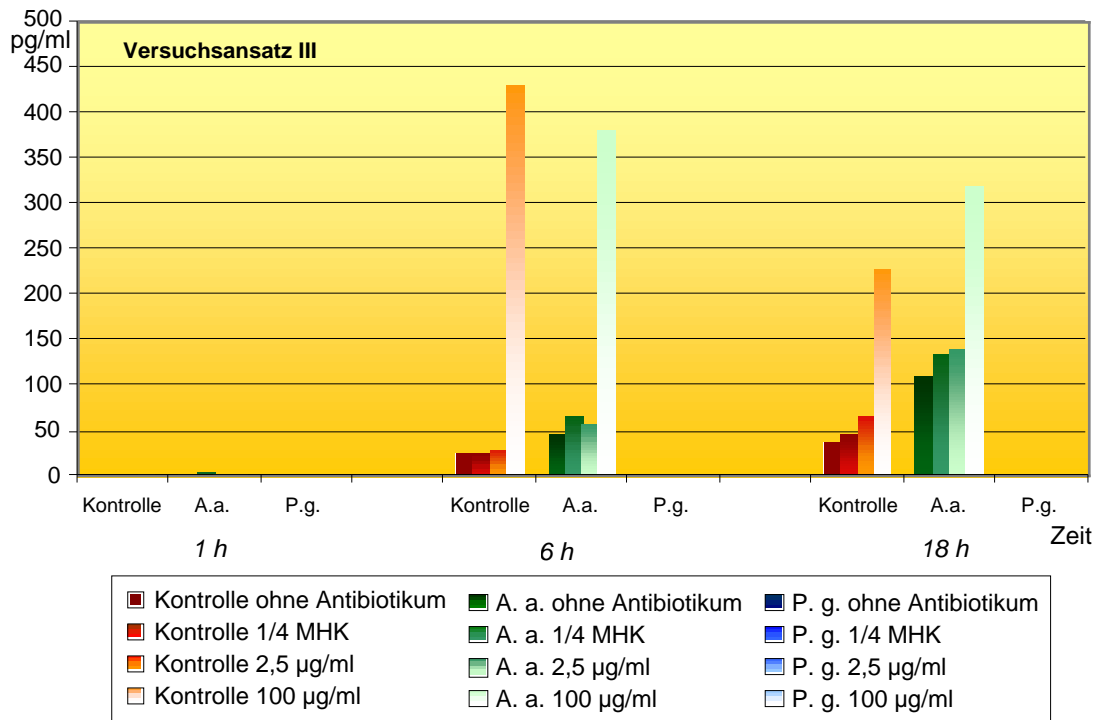


Abb. 18: Freisetzung von IL-8 bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

TGF-β1

Ansatz I - Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Die Vorinkubation der KB-Zellen mit dem Antibiotikum wirkte sich auf die Freisetzung von TGF-β1 stammspezifisch unterschiedlich aus. Während es bei den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierten Zellen durch Zugabe von Moxifloxacin zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der TGF-β1-Sezernierung kam, konnte bei *P. gingivalis* ATCC 33277 mit zunehmender Inkubationszeit und Antibiotikumkonzentration eine leicht gesteigerte Freisetzung des Wachstumsfaktors nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der mit *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Zellen ähnelten denen der nicht infizierten Zellen. Die Zytokinfreisetzung erhöhte sich bei *P. gingivalis* ATCC 33277 mit einer Konzentration von 100 µg/ml Moxifloxacin nach 6 h und 18 h auf das 1,2 fache. Bei den nicht infizierten Zellen wurde bei gleicher Antibiotikummenge innerhalb von 18 h eine Zunahme von TGF-β1 um 10% notiert. Ohne Moxifloxacin setzten die nicht infizierten Zellen in dieser Zeit 256 pg/ml TGF-β1 frei (Abb. 19).

Im Gegensatz dazu verminderten sich die Zahlen des sezernierten Zytokins TGF- β 1 bei A. actinomycetemcomitans Y4 um so deutlicher, je höher die zugegebenen Moxifloxacinkonzentrationen waren und je länger die Inkubationszeit andauerte. So wurden nach 18 h Reduktionen des TGF- β 1-Spiegels auf 73,8% (1/4 MHK), auf 53,2% (2,5 μ g/ml) und auf 32% (100 μ g/ml) registriert (Abb. 19).

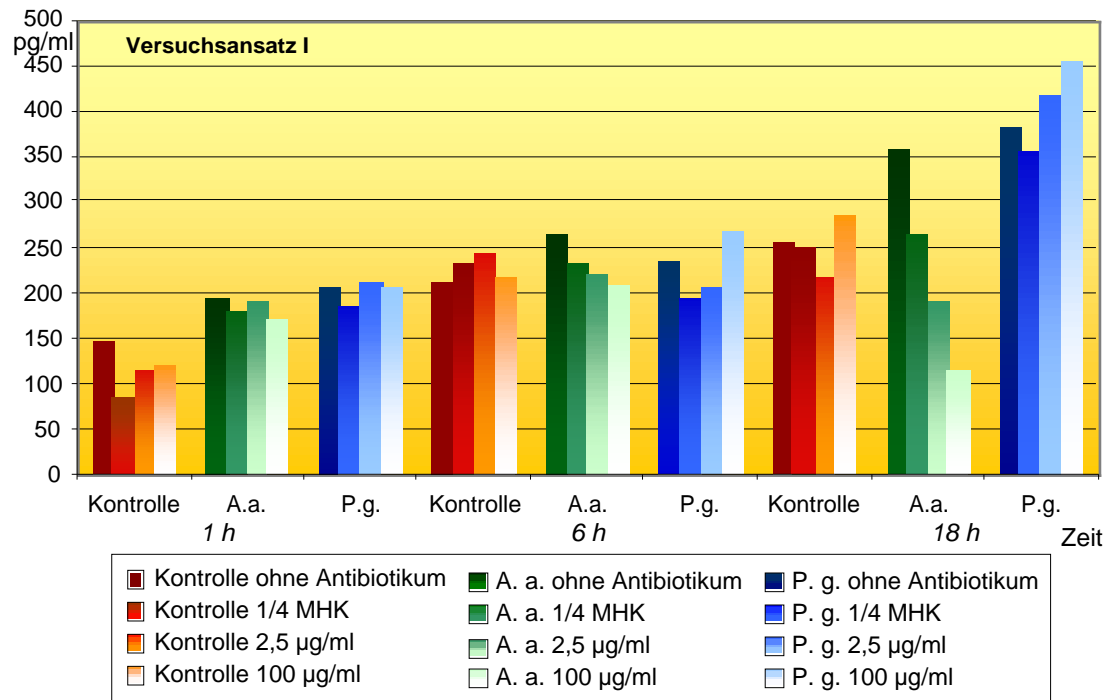


Abb. 19: Freisetzung von TGF- β 1 bei Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin

Ansatz II - Vorinkubation der Bakterien mit dem Antibiotikum

Nach Vorinkubation der Bakterien mit dem Antibiotikum konnten sowohl bei *P. gingivalis* ATCC 33277 als auch bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 einheitliche Ergebnisse erfasst werden. Bei beiden Stämmen sank die TGF- β 1-Freisetzung in Abhängigkeit von Moxifloxacin. Mit Zugabe der höchsten Antibiotikumkonzentration (100 μ g/ml) wurden für *P. gingivalis* ATCC 33277 Verringerungen der Zytokinausschüttung auf 51,3% (1 h), auf 23,6% (6 h) und auf 50,8% (18 h) dokumentiert. Die Werte für *A. actinomycetemcomitans* Y4 waren ähnlich. Nach 6 h betrug die TGF- β 1-Sezernierung bei 100 μ g/ml Moxifloxacin 50,1%, nach 18 h wurde eine Reduktion auf 30,1% ermittelt. Die TGF- β 1-Freisetzung erhöhte sich bei den nicht infizierten Zellen nach 6 h auf das 1,3 fache und nach 18 h auf das 2,2 fache (Abb. 20).

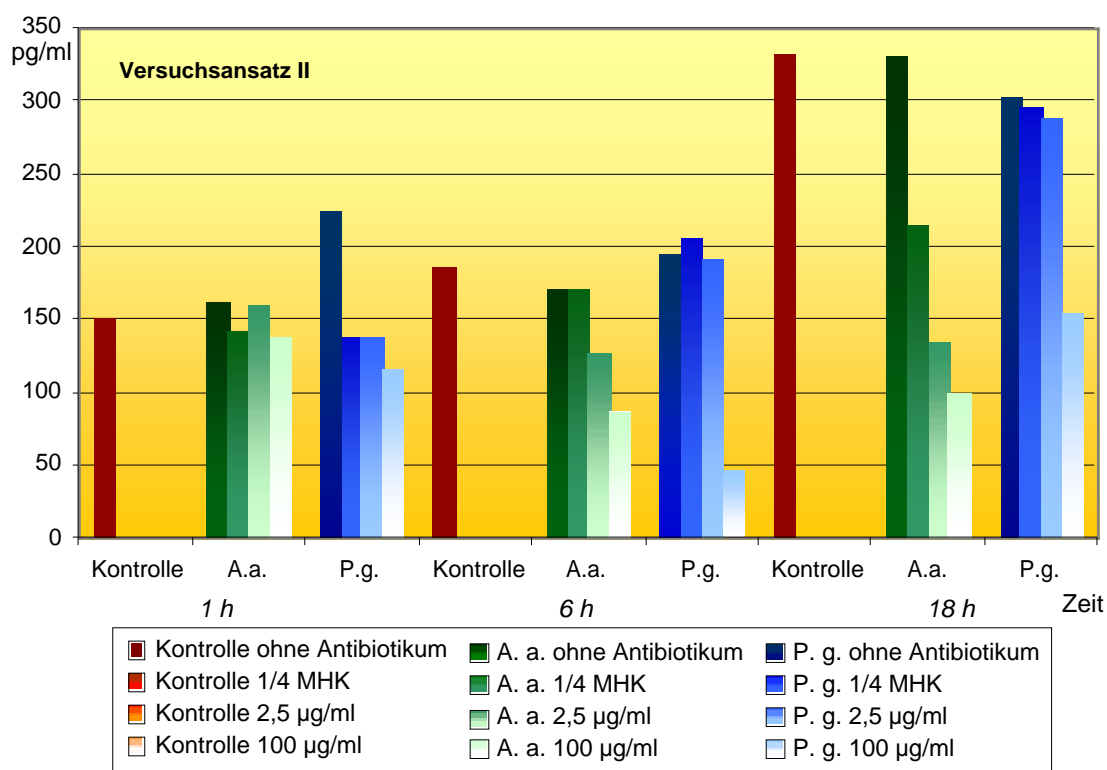


Abb. 20: Freisetzung von TGF- β 1 aus den KB-Zellen bei Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin

Ansatz III – Gleichzeitige Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

Die gleichzeitige Zugabe der Mikroorganismen und des Antibiotikums zu den KB-Zellen zeigte sowohl bei den nicht infizierten Zellen als auch bei *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 zu allen Inkubationszeiten einheitliche Ergebnisse. Es kann daher zusammengefasst werden, dass Moxifloxacin die TGF- β 1-Freisetzung konzentrationsabhängig reduziert hat. Dabei korrelierte das Ausmaß der Verringerung direkt mit der Menge des zugesetzten Antibiotikums (Abb. 21).

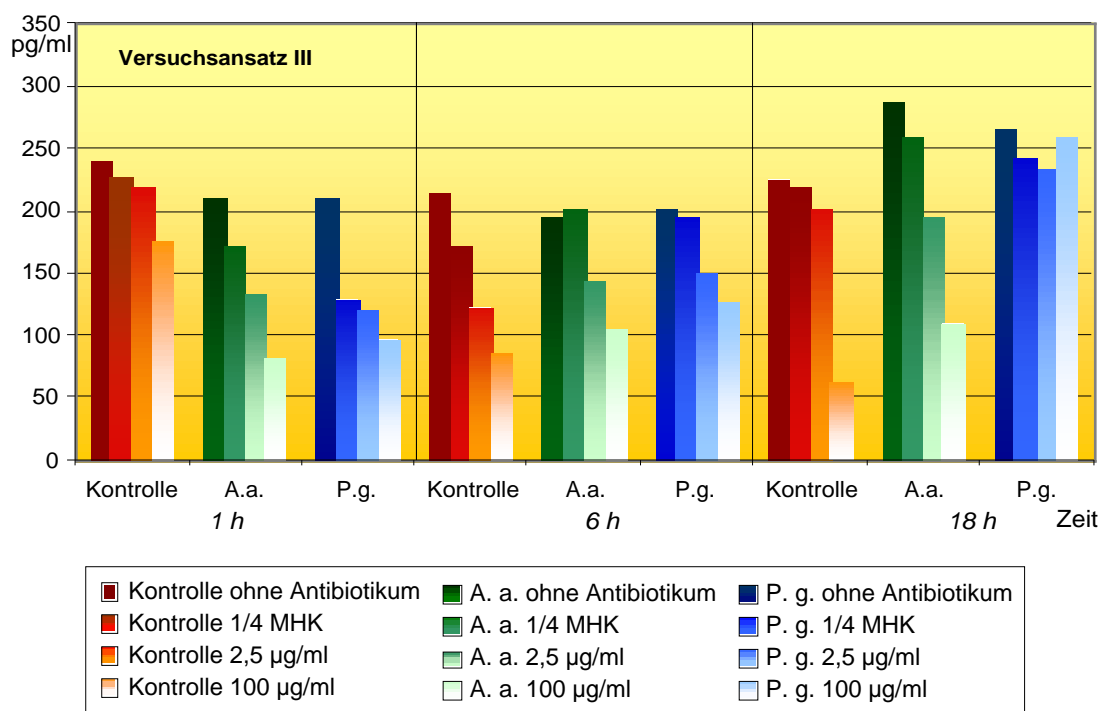


Abb. 21: Freisetzung von TGF- β 1 bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und des Antibiotikums zu den KB-Zellen

6. Diskussion

Die Applikation eines Antibiotikums als Option bei der Behandlung parodontaler Erkrankungen hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Zwar gelingt es, durch Anwendung rein mechanischer Verfahren den Biofilm als Lebensraum der pathogenen Mikroorganismen zu zerstören, die Leukotoxine an den Wurzeloberflächen zu entfernen und die Entzündungen primär einzudämmen, doch werden häufig Reinfektionen und Keimpersistenzen beobachtet (Chaves et al. 2000, Sigusch et al. 2001). Die vollständige Eliminierung der Erreger aus der Mundhöhle scheint auf diesem Wege nicht realisierbar.

Verschiedene Antibiotika wurden daher in zahlreichen Studien auf ihre Wirksamkeit gegenüber den parodontopathogenen Mikroorganismen untersucht. Übereinstimmend wurde bisher festgestellt, dass die alleinige medikamentöse Behandlung zur Beseitigung der Bakterien nicht ausreichend ist, in Kombination mit manueller Versorgung aber gute Therapieerfolge erzielt werden können (van Winkelhoff et al. 1989, Sigusch et al. 2001).

Diese Studie hat sich mit der Frage beschäftigt, ob das Fluorchinolon Moxifloxacin die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus mit parodontopathogenen Keimen infizierten KB-Zellen beeinflussen kann. Zudem sollte der Effekt des Antibiotikums auf die Adhärenz und Invasion der Mikroorganismen *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 an Epithelzellen untersucht werden.

6.1. Methodik

Die Versuche unserer Arbeit wurden an KB-Zellen durchgeführt. Diese entstammen einem oralen Epidermoidkarzinom und stellen eine permanente Zelllinie dar. KB-Zellen wurden bereits von etlichen Forschungsgruppen verwendet (Meyer et al. 1996, Madianos et al. 1996, Eick and Pfister 2004), da sie standardisierte Bedingungen für eine Vielzahl von Untersuchungen ermöglichen. Um in unserer Studie vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, arbeiteten wir bei allen Versuchsansätzen zur Bestimmung der Adhärenz und Invasion mit KB-Zellen in niedriger Passage.

Genau wie die humanen Gingivaepithelzellen setzen KB-Zellen proinflammatorische Zytokine frei (Sandros et al. 2000). Dennoch spiegeln diese Zelllinien die Verhältnisse der oralen Kavität nur bedingt wider:

So besitzt die KB-Zelllinie laut Lamont et al. (1992b) andere Oberflächenmoleküle und somit andere Rezeptorstrukturen als die intraoral vorkommenden Epithelzellen. Folglich sollen Unterschiede in der Adhärenz an diese Zellen bestehen. Sandros et al. (1994) beschrieben, dass die KB-Zellen über geringere Rezeptorzahlen verfügen als die intraoralen Taschenepithelien.

Des Weiteren handelt es sich bei dem Epithel der Mundschleimhaut und der Gingiva um mehrschichtiges Plattenepithel, das überwiegend aus Keratinozyten besteht. Vereinzelt sind auch Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen zu finden. Eine Basalmembran grenzt das Epithel gegenüber der darunter liegenden, bindegewebigen Lamina propria ab (Bucher und Wartenberg, 1989).

Für unsere Versuche hingegen wurden Monolayer-Schichten verwendet. Um die Versuchsansätze den intraoralen Verhältnissen zukünftig noch besser anzupassen, könnten weiterführende Untersuchungen an Multilayer-Schichten auf kollagenbeschichteten Platten vorgenommen werden.

Die Ergebnisse unserer Studie differieren in Abhängigkeit vom gewählten Versuchsansatz. Zwar wurden bei allen Untersuchungen die gleichen Komponenten verwendet, doch unterschieden sich die Versuchsansätze stark im anfänglichen Ablauf. In Versuchsansatz I wurden die KB-Zellen für 1 h mit Moxifloxacin vorinkubiert. Die Zugabe der Bakterien erfolgte erst im Anschluss, nach dem Waschen der Zellen. Beim Versuchsansatz II erfolgte die einstündige Vorinkubation der Mikroorganismen mit dem Antibiotikum, dann wurde die Suspension zentrifugiert, gewaschen und schließlich den Zellen zugegeben. Beide Versuchsansätze wurden durchgeführt, um isolierte Effekte des Antibiotikums Moxifloxacin auf die KB-Zellen bzw. die Bakterien bestimmen zu können.

Bei Versuchsansatz III hingegen wurden die Bakterien und Moxifloxacin den KB-Zellen zeitgleich zugegeben. Die darauf folgende, direkte Inkubationszeit des Antibiotikums auf die

Erreger und die Zellen betrug also bis zu 18 h. Dieser Ansatz liefert daher in Bezug auf die antibakterielle Wirksamkeit stets die deutlichsten Resultate.

6.2. Adhärenz und Invasion

Die Fähigkeiten der pathogenen Mikroorganismen *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*, sich an Epithelzellen der Gingiva anzulagern und in diese einzudringen, stellen entscheidende Schritte im Verlauf parodontaler Erkrankungen dar. In den Zellen induzieren die Bakterien durch Freisetzung von Zytokinen, Matrixmetallproteinase und Prostaglandinen sowohl den Attachmentverlust als auch den Abbau des alveolären Knochens (Birkedal-Hansen 1993, Kornman and Page 1997).

In dieser Studie wurde das Antibiotikum Moxifloxacin auf seine Wirksamkeit gegenüber den parodontopathogenen Stämmen *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 untersucht. Das Präparat zählt zu der Gruppe IV der Fluorchinolone (PEG 1998), die sich durch eine verbesserte Aktivität gegenüber anaeroben Mikroorganismen auszeichnen.

Moxifloxacin konnte sowohl extra- als auch intrazellulär eine gute Wirksamkeit gegen die von uns untersuchten Bakterienstämme zugeschrieben werden. So ist es bei gleichzeitiger Zugabe des Antibiotikums und der Bakterien zu den Zellen innerhalb von 18 h gelungen, die adhären, internalisierten und freien *A. actinomycetemcomitans* Y4 mit Konzentrationen von 2,5 µg/ml bzw. 100 µg/ml Moxifloxacin um mehr als 99% zu minimieren bzw. sie sogar vollständig zu eliminieren. Bereits Antibiotikumkonzentrationen von 1/4 MHK reduzierten die Erregerzahlen in diesem Ansatz nach 18 h auf 1,6%.

Der für die stark bakterizide Wirkung verantwortliche Mechanismus des Fluorchinolons basiert auf der Hemmung der ATP-abhängigen und DNS-Gyrase-katalysierten DNS-Verschraubungsreaktion. Die eigenen Gyrasen vom Topoisomerase-Typ II sind für die Bakterien essentiell bei der Replikation, Transkription und Reparatur der bakteriellen DNS. Moxifloxacin inhibiert diese Gyrasen, die Spiralbildung bleibt aus und die DNS ist folglich nicht mehr decodierbar (Oberdisse 2002).

Die große intrazelluläre Effektivität wird durch das hohe Verteilungsvolumen ermöglicht. Moxifloxacin ist gut gewebeängig und zudem in der Lage, sich schnell intrazellulär anzusammeln (Stahlmann und Lode 2005). Diese Fähigkeit führte in unseren Versuchen dazu, dass nicht nur die freien und adhären, sondern auch die invasiven *A. actinomycetemcomitans* Y4 innerhalb der Inkubationszeit nahezu eliminiert werden konnten. Die Anreicherung erfolgt in Epithelzellen jedoch nur vorübergehend, während die Konzentrierung in PMNs irreversibel ist (Pascual et al. 1999).

Die Ergebnisse unserer Studie stimmen mit denen anderer Autoren überein. So untersuchten Müller et al. (2002) in vitro 60 klinische Isolate von *A. actinomycetemcomitans* auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 7 verschiedenen Antibiotika. Alle Proben waren hoch empfindlich auf das Fluorchinolon Moxifloxacin, so dass diese Gruppe dem Medikament aufgrund seiner vorteilhaften Pharmakokinetik und hohen Effizienz eine zunehmende Bedeutung bei der adjuvanten Antibiotikatherapie zuspricht (Müller et al. 2002).

Auch die Studien von Bauernfeind (1997), Mac Gowan (1997) und Shalit et al. (2001) zeigten ähnliche Resultate bezüglich der Wirksamkeit von Moxifloxacin, auch wenn diese die oralen Anaerobier nur vereinzelt untersucht haben.

Bei einstündiger Vorinkubation der Mikroorganismen mit dem Antibiotikum reichten die zugegebenen Moxifloxacinkonzentrationen nicht aus, *A. actinomycetemcomitans* Y4 zu minimieren. Wir beobachteten bei diesem Versuchsansatz eine moxifloxacinabhängige Zunahme der adhären und invasiven Keimzahlen. Dabei korrelierte der Anstieg der Bakterienzahlen direkt mit der Menge des zugesetzten Antibiotikums.

Wir vermuten, dass Moxifloxacin eine Inaktivierung von Virulenzfaktoren verursacht hat und die Toxizität der Bakterien somit vermindert war. In der Literatur wird von Sugai et al. (1998) ein *A. actinomycetemcomitans* Y4 eigenes Zytotoxigen CDT beschrieben, das in der Lage ist, den Zellzyklus der Wirtszellen in der G₂/M-Phase zu blockieren. Es wird von drei Genen codiert und scheint verantwortlich für die hohe Zytotoxizität dieses Bakterienstammes. Sugai et al. (1998) gaben in ihren Untersuchungen an HeLa-Zellen zu den *A. actinomycetemcomitans* Y4-CDT-Proben die speziell entwickelten Antiseren anti-CDT und konnten damit die Zytotoxizität neutralisieren. Möglicherweise besitzt Moxifloxacin die Fähigkeit, einen ähnlichen Effekt auf diese Spezies auszulösen und *A.*

actinomycetemcomitans Y4 konnte nach der Vorinkubation deshalb vermehrt an die KB-Zellen adhäreren und in diese penetrieren.

Trotz der offensichtlich hohen Effizienz des Fluorchinolons muss berücksichtigt werden, dass die Persistenz in Epithelzellen über einen längeren Zeitraum nicht zu den Virulenzfaktoren von *A. actinomycetemcomitans* zählt. Es ist zudem unklar, ob sich diese Keimart in Epithelzellen replizieren kann (Meyer et al. 1996).

P. gingivalis hingegen verfügt über die Fähigkeiten, ohne Zellschädigung und unter Ausschaltung der wirtseigenen Immunabwehr in den Epithelzellen zu persistieren und sich dort zu vermehren (Madianos et al. 1996). Dieser Virulenzfaktor ist möglicherweise von Bedeutung für das Fortbestehen einer chronischen parodontalen Infektion.

Dem Antibiotikum Moxifloxacin konnte in unseren Untersuchungen dennoch auch gegenüber *P. gingivalis* ATCC 33277 eine starke Wirkung bescheinigt werden. So sanken die Werte freier und adhärenter Bakterien im Mischansatz nach 18 h bereits bei den niedrigeren Antibiotikumkonzentrationen deutlich, bei 100 µg/ml Moxifloxacin betrug die Keimreduktion mehr als 99%. Die internalisierten Mikroorganismen wurden bei dieser Konzentration innerhalb der Inkubationszeit sogar vollständig eliminiert. Diese Ergebnisse erklären wir ebenfalls mit der Fähigkeit des Fluorchinolons, sich rasch intrazellulär anzusammeln, und der stark bakteriziden Wirkung des Präparates.

Auch Eick und Pfister (2004) testeten den Einfluss von 4 verschiedenen Antibiotika, darunter Moxifloxacin, auf intrazelluläre parodontopathogene Keime an KB-Zellen. Diese Studie bestätigt dem Fluorchinolon eine hohe Effizienz gegenüber *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277. So konnte *P. gingivalis* nach 12 h mit einer Moxifloxacinkonzentration von 100 µg/ml vollständig abgetötet werden (Eick and Pfister 2004).

Die mit Antibiotikumkonzentrationen von 100 µg/ml erzielten Ergebnisse wären bei lokaler Applikation auf in vivo vorherrschende Gegebenheiten übertragbar. Bei systemischer Gabe können derart hohe Wirkspiegel intraoral über einen längeren Zeitraum nicht aufrechterhalten werden. Zudem wurden die Stämme in unseren Studien einzeln untersucht. Da aber sowohl *P. gingivalis* als auch *A. actinomycetemcomitans* zu den späten Besiedlern der Mundhöhle

zählen, binden sie nicht nur an prolinreiche Proteine und Glykoproteine des Speichels (Lamont and Jenkinson 1998), sondern auch an bereits vorhandene Mikroorganismen (Kolenbrander 1993, Cook et al. 1998). Die Struktur des intraoralen Biofilms ist aufgrund dieser zahlreichen Koaggregationen folglich wesentlich komplexer, was den Zugriff der Medikamente auf die Bakterien zusätzlich erschweren dürfte.

6.3 Freisetzung der Zytokine

Zytokine stellen essentielle Bestandteile bei der Bereitstellung einer funktionierenden Immunabwehr dar, wirken jedoch bei unkontrollierter, überschießender Freisetzung ebenso zerstörend und pathogen (Kelso 1990). Der Einfluss von Moxifloxacin auf die Sezernierung der proinflammatorischen Interleukine aus mit parodontopathogenen Bakterien infizierten Epithelzellen spielt daher eine bedeutende Rolle bei Beurteilung der Wirksamkeit des Fluorchinolons.

Interleukin - 1 β , Interleukin - 6 und Tumornekrosefaktor - α

In unseren Versuchen konnten wir weder bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 noch bei den mit *P. gingivalis* ATCC 33277 infizierten Zellen eine Freisetzung der Zytokine IL-1 β und TNF- α beobachten. Die Nachweisgrenze von 2 pg/ml wurde, unabhängig vom Versuchsansatz, zu keinem Zeitpunkt erreicht oder überschritten. Damit weichen unsere Ergebnisse von denen anderer Studien ab, allerdings arbeiteten diese auch nicht mit KB-Zellen.

So bestimmten Rawlinson et al. (2000) die in vivo-Konzentrationen des Zytokins IL-1 β an blutenden, parodontal erkrankten Stellen und verglichen diese mit den zeitgleich gemessenen Werten gesunder Proben. Dabei stellten sie einen massiven Anstieg des Interleukins in den infizierten Taschen fest. Sie schließen daher auf eine direkte Korrelation zwischen der IL-1 β -Ansammlung in der Sulkusflüssigkeit und dem Schweregrad einer Parodontitis (Rawlinson et al. 2000).

Auch Preiss und Meyle (1994) konnten berichten, dass entzündetes Parodontalgewebe wesentlich mehr IL-1 β enthielt als damit verglichene, gesunde Proben. So ermittelten sie aus

der Sulkusflüssigkeit infizierter Taschen Interleukinkonzentrationen bis 882,2 ng/ml, während die Kontrollwerte bei maximal 150 ng/ml lagen (Preiss and Meyle 1994).

In unseren in vitro-Untersuchungen war keine Sezernierung von IL-1 β zu verzeichnen. Als Quelle für diese Zytokine gelten Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und Mastzellen (Okada and Murakami 1998). Wir führten unsere Versuche jedoch ausschließlich an KB-Zellen durch. Diese sind, genau wie die Gingivaepithelzellen, nicht dafür bekannt, IL-1 β freizusetzen.

IL-6 wird von infizierten Parodontien ebenfalls vermehrt sezerniert. Kurtis et al. (1999) und Mogi et al. (1999) konnten zeigen, dass die IL-6-Werte in der Sulkusflüssigkeit erkrankter Patienten im Vergleich zu denen gesunder Probanden bis auf das Doppelte erhöht waren (Kurtis et al. 1999, Mogi et al. 1999).

In unserer Studie konnten wir nur bei gleichzeitiger Zugabe von Bakterien und Moxifloxacin zu den KB-Zellen eine IL-6-Freisetzung feststellen. Hohe Moxifloxacinkonzentrationen und lange Inkubationszeiten scheinen die Sezernierung dieses Zytokins zu fördern. So induzierten 100 μ g/ml Antibiotikum bei den nicht infizierten Zellen einen IL-6-Anstieg auf 21 pg/ml.

Auch die mit *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Epithelzellen setzten in geringen Mengen IL-6 frei. Wir nehmen an, dass die *P. gingivalis* ATCC 33277 eigenen Cysteinproteasen durch die stark bakterizide Wirkung von Moxifloxacin inaktiviert wurden und die Zytokinfreisetzung aus den KB-Zellen dadurch nachgewiesen werden konnte.

Nach Vorinkubation der KB-Zellen mit den Bakterien bzw. dem Antibiotikum blieb die IL-6-Sezernierung bei beiden Spezies aus, obwohl wir bei den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierten Zellen eine messbare Freisetzung erwartet hätten. Wir erklären dies mit dem von uns verwendeten, serumfreien Zellkulturmedium EMEM (Fa. BioWhittaker, Verviers, Belgien). Eick et al. arbeiteten 2002 im Rahmen einer ähnlichen Untersuchung mit dem gleichen Medium, setzten jedoch 10% fetales Kälberserum zu und konnten eine vermehrte IL-6-Sezernierung aus den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierten KB-Zellen dokumentieren. So wurden innerhalb der 6 h Inkubationszeit Zytokinkonzentrationen von 60 pg/ml gemessen (Eick et al. 2002).

TNF- α wird in vivo hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten freigesetzt (Okada and Murakami 1998). Reißmann (2005) gelang es zwar, die Expression von mRNA von TNF- α aus KB-Zellen zu detektieren, jedoch auch nur in sehr geringen Mengen. In unseren Versuchen blieb die Nachweisgrenze von 2 pg/ml unerreicht.

Interleukin - 8

In unserer Studie setzten die nicht infizierten KB-Zellen kontinuierlich IL-8 frei. In Abhängigkeit der zugegebenen Moxifloxacinkonzentrationen konnten wir zudem einen deutlichen Anstieg der IL-8-Werte bei den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierten KB-Zellen feststellen. Je mehr Antibiotikum zugegeben wurde, desto größer war die Zytokinfreisetzung.

Diese Ergebnisse bestätigen auch Sfakianakis et al. (2001), die in ihren Untersuchungen eine permanente Sezernierung des Zytokins aus nicht stimulierten Gingivaepithelzellen beobachtet haben. Zudem beschreiben sie eine konzentrationsabhängige Erhöhung der IL-8-Werte nach Zugabe von *A. actinomycetemcomitans*-Extrakt. Den größten Interleukinanstieg ermittelten sie bei einer Konzentration des *A. actinomycetemcomitans*-Extraktes von 50 μ g/ml in einem Zeitraum von 12-24 h (Sfakianakis et al. 2001).

Huang et al. (1998a) lieferten ebenfalls ähnliche Resultate. Nach Infektion ihrer Gingivaepithelzellen mit vitalen *A. actinomycetemcomitans* registrierten sie eine massiv erhöhte IL-8-Freisetzung. Die Werte stiegen bis auf das 7 fache an (Huang et al. 1998a).

Uchida et al. (2001) vermuten, dass bestimmte Oberflächenmerkmale eines Erregers die erhöhte IL-8-Expression aus Gingivaepithelzellen verursachen könnten, da in ihren Untersuchungen sowohl vitale als auch vorher abgetötete *A. actinomycetemcomitans* einen deutlichen Anstieg der Zytokinfreisetzung induzierten (Uchida et al. 2001).

Im Gegensatz dazu zeigten Sfakianakis et al. (2001), dass die Lipopolysaccharide von *A. actinomycetemcomitans* keinen Einfluss auf die IL-8-Freisetzung aus Gingivaepithelzellen haben. Sie inkubierten die Mikroorganismen mit 100 μ g/ml Polymyxin B und gaben diese Suspensionen anschließend zu den Zellen. Das Polymyxin B inaktiviert dabei die Lipopolysaccharide der Erreger. In der Auswertung konnte bei den mit Polymyxin B

behandelten *A. actinomycetemcomitans* keine Verminderung der IL-8-Sezernierung aus den Gingivaepithelzellen notiert werden (Sfakianakis et al. 2001).

Die Ergebnisse der in der Literatur beschriebenen Studien stimmen somit weitestgehend mit unseren Resultaten überein. Auch wir konnten einen deutlichen Anstieg der IL-8-Freisetzung sowohl bei den nicht infizierten Zellen als auch bei den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 inkubierten KB-Zellen feststellen. Die Erhöhung korrelierte direkt mit der Einwirkzeit. Zudem ist ein klarer Zusammenhang zu dem beigefügten Moxifloxacin erkennbar. Je mehr Antibiotikum der Probe zugesetzt wurde, desto höher war die Freisetzung der Interleukine. So notierten wir in bei gleichzeitiger Zugabe von Bakterien und Antibiotikum zu den KB-Zellen bei 100 µg/ml Moxifloxacin Werte, die bis auf das 16 fache angestiegen waren.

Neben seiner keimeliminierenden Wirkung ist Moxifloxacin offensichtlich in der Lage, die Freisetzung von IL-8 aus oralen Epithelzellen zu fördern und somit eventuell die lokale Immunantwort zu stimulieren.

Auch Araujo et al. (2002) bestätigen dem Fluorchinolon einen immunmodulatorischen Effekt. Sie untersuchten die Wirkung verschiedener Moxifloxacinkonzentrationen auf mit LPS stimulierte Monozyten in vitro und konnten eine signifikante Hemmung der Freisetzung der Interleukine IL-1 β und TNF- α dokumentieren. Auch die IL-6-, IL-10- und IL-12-Werte sanken in Abhängigkeit der zugegebenen Antibiotikamengen. Da Moxifloxacin im Gegensatz dazu in unseren Untersuchungen an KB-Zellen eine stimulierende Wirkung auf die Interleukinfreisetzung zeigte, scheint der immunmodulatorische Effekt stark abhängig vom jeweiligen Zelltyp zu sein.

Dennoch konnten wir in unseren Untersuchungen zu keinem Zeitpunkt eine Sezernierung des Chemokins aus den mit *P. gingivalis* ATCC 33277 infizierten Zellen beobachten. Unabhängig vom Versuchsansatz ist der Anaerobier offensichtlich auch unter Zugabe hoher Moxifloxacinkonzentrationen fähig, das Zytokin abzubauen.

Wir führen diese Ergebnisse darauf zurück, dass *P. gingivalis* über arginin- bzw. lysin-spezifische Cysteinproteasen verfügt, die es ihm ermöglichen, die freigesetzten Zytokine proteolytisch abzubauen (Potempa et al. 1997).

So zeigten Zhang et al. (1999), dass orale und gingivale Epithelzellen auch nach einer Infektion mit *P. gingivalis* noch IL-8 produzieren, die Zytokine aber nach ihrer Freisetzung von den Proteasen zerstört werden. Dazu inkubierte die Forschungsgruppe IL-8-haltige Proben mit *P. gingivalis*. Die Interleukine wurden rasch abgebaut. Setzten sie jedoch Proteaseinhibitoren zu, verringerte sich die IL-8-Abnahme deutlich. Damit wurde die Inaktivierung der Zytokine durch die Proteasen belegt (Zhang et al. 1999).

Auch Huang et al. (1998b) stellten fest, dass die Anwesenheit von *P. gingivalis* vorhandenes IL-8 in den Zellen reduziert. Sie infizierten Gingivaepithelzellen zunächst mit *A. actinomycetemcomitans* und konnten eine vermehrte Synthese des Zytokins beobachten. Anschließend inkubierten sie dieselben Zellen mit *P. gingivalis*. Die IL-8-Werte sanken stark ab. So konnten sie dokumentieren, dass *P. gingivalis* in der Lage ist, auch das von anderen Spezies in Epithelzellen akkumulierte IL-8 abzubauen (Huang et al. 1998b).

Diese Ergebnisse verdeutlichen den starken Einfluss von *P. gingivalis* auf das empfindliche Netzwerk der Zytokine. Einerseits induziert er deren massive Freisetzung durch seine Fähigkeit zur Persistenz in den Zellen, andererseits eliminiert er sie mit Hilfe seiner Proteasen aus ihrem Wirkungsfeld.

Hinzu kommen Studien in der Literatur, die darauf hinweisen, dass *P. gingivalis*-Stämme über lösliche Proteasen verfügen, welche in das parodontale Gewebe diffundieren und dort die Freisetzung von IL-8 wiederum fördern können (Mikolajczyk-Pawlinska et al. 1998). In unserer in vitro-Studie an KB-Zellen war eine solche Zytokinausschüttung nicht zu erwarten. *P. gingivalis* ATCC 33277 besitzt zudem überwiegend zellwandgebundene Proteasen.

Der Anaerobier scheint das Immunsystem also sowohl durch den Abbau als auch durch die Freisetzung von IL-8 modulieren zu können. Das Ausschalten der Wirtsabwehr sichert ihm dabei das Überleben in den Zellen, während die Sezernierung der Zytokine zur Aufrechterhaltung der chronischen parodontalen Entzündung beiträgt.

Transforming Growth Factor - β 1

In unseren Untersuchungen notierten wir in Abhängigkeit der vorhandenen Moxifloxacinkonzentrationen sowohl bei den nicht infizierten als auch bei den mit *P.*

gingivalis ATCC 33277 bzw. *A. actinomycetemcomitans* Y4 inkubierten KB-Zellen eine Verringerung der TGF- β 1-Freisetzung. Die Reduktion war umso deutlicher, je mehr Antibiotikum zugesetzt wurde. So sanken die Werte bei gleichzeitiger Zugabe des Bakterienstammes und des Antibiotikums zu den KB-Zellen innerhalb der 18 stündigen Inkubationszeit bei 100 μ g/ml Moxifloxacin bis auf 32% ab.

Wenngleich die Bedeutung des Wachstumsfaktors bei der Progression einer Parodontitis bisher noch nicht aufgeklärt ist, gilt TGF- β 1 als wichtiger Stimulator der Wundheilung, vor allem bei der bindegewebigen Regeneration. Kuru et al. (2004) untersuchten dazu die Freisetzung des Zytokins aus der Sulkusflüssigkeit parodontal erkrankter Patienten, bei denen partiell eine konventionelle Lappenoperation durchgeführt werden musste und verglichen diese Werte mit denen aus nicht infizierten, gesunden Parodontien derselben Probanden. Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass die TGF- β 1-Werte in der Sulkusflüssigkeit der chirurgisch behandelten Taschen auch zwei Wochen nach dem Eingriff noch auf das Doppelte erhöht waren. Kuru et al. (2004) sehen die gesteigerte TGF- β 1-Sezernierung daher als wichtigen Bestandteil im Heilungsprozess parodontaler Erkrankungen.

Auch Steinsvoll et al. (1999) berichteten, dass entzündetes Parodontalgewebe in ihren Studien 100 fach mehr TGF- β 1 enthielt als Proben von parodontal gesunden Personen. Unter Anwendung einer Immunfluoreszenzfärbung konnten sie dieses Zytokin vor allem in Makrophagen (21-43%), neutrophilen Granulozyten (34-35%) und Mastzellen (7-10%) lokalisieren (Steinsvoll et al. 1999).

In unserer Studie bewirkte das zugegebene Moxifloxacin eine deutlichen Reduktion der TGF- β 1-Freisetzung. Der Wachstumsfaktor induziert in vivo die Synthese von Kollagen, Fibronectin, Proteoglykanen, Osteonectin und anderen Stoffen und hat zudem Einfluss auf die Knochenbildung (Okada and Murakami 1998). Auf die Synthese von Matrixmetallproteinase, wie Kollagenasen, wirkt er hingegen hemmend (Overall et al. 1991). Eine Reduzierung der TGF- β 1-Freisetzung durch die Applikation des Fluorchinolons könnte folglich einen unerwünschten, hemmenden Effekt auf die Wundheilung ausüben, sodass weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet unumgänglich sind.

7. Schlussfolgerungen

Das Fluorchinolon Moxifloxacin zeigt eine hohe Effizienz gegenüber den untersuchten Bakterienstämmen *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4. Bereits geringe Antibiotikuzugaben bewirken eine deutliche Reduktion der adhären, internalisierten und frei vorkommenden Mikroorganismen beider Stämme, höhere Moxifloxacinkonzentrationen ermöglichen sogar die vollständige Eliminierung der pathogenen Erreger.

Die markanten Ergebnisse bei den internalisierten Bakterien belegen, dass Moxifloxacin in der Lage ist, innerhalb kurzer Zeit in KB-Zellen einzudringen, ohne dabei seine antibakterielle Aktivität zu verringern.

Moxifloxacin fördert zudem konzentrationsabhängig die Freisetzung von IL-8 aus oralen Epithelzellen und kann somit die lokale Immunantwort stimulieren. Diese Ergebnisse werden bei nicht infizierten und mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 inkubierten KB-Zellen erzielt.

Auch die nicht infizierten Epithelzellen setzen kontinuierlich IL-8 frei. KB-Zellen sind folglich gut geeignet für derartige Untersuchungen.

P. gingivalis ATCC 33277 verfügt über arginin- bzw. lysinspezifische Cysteinproteasen, die es ihm ermöglichen, sezernierte Zytokine proteolytisch abzubauen. Aus den mit diesem Stamm inkubierten KB-Zellen ist daher keine Freisetzung der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α nachweisbar. Die Fähigkeit, das Immunsystem derart modulieren zu können, sichert dem Anaerobier das Überleben innerhalb des Wirtsorganismus.

Aufgrund seiner vorteilhaften Pharmakokinetik und der offensichtlich hohen Effizienz gegenüber parodontopathogenen Mikroorganismen sollte Moxifloxacin in zukünftigen klinischen Studien als Option bei der adjuvanten Antibiotikatherapie Berücksichtigung finden.

8. Literaturverzeichnis

1. Abe N, Kadowaki T, Okamoto K, Nakayama K, Ohishi M and Yakamoto K. 1998. Biochemical and functional properties of lysine-specific cysteine proteinase (lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis*. J Biochem, 123: 305-312.
2. Agarwal S, Chandra CS, Piesco NP, Langkamp HH, Bowen L and Baran C. 1998. Regulation of periodontal ligament cell functions by interleukin 1-beta. Infect Immun, 66: 932-937.
3. Alexander MB and Damoulis PD. 1994. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. Curr Opin Periodontol, 1: 39-53.
4. Amano A, Shizukuishi S, Horie H, Kimura S, Morisaki I and Hamada S. 1998. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via domain shared by major salivary components. Infect Immun, 66: 2072-2077.
5. Araujo FG, Slifer TL and Remington JS. 2002. Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. Clin Microbiol Infect, 8: 26-30.
6. Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol, 4: 1-6.
7. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S and Graves DT. 1998. IL-1 and TNF-antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol, 160: 403-409.
8. Avila-Campos MJ. 1995. Haemolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains on different blood types. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 37: 215-217.
9. Bainbridge B and Darveau R. 2001. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defence system. Acta Odontol Scand, 59: 131-138.
10. Baker P and Wilson M. 1989. Opsonic IgG antibody against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. Oral Microbiol Immunol, 4: 98-105.
11. Balkwill FR and Burke F. 1989. The cytokine network. Immunol Today, 10: 299-304.
12. Bauernfeind A. 1997. Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother, 40: 639-651.

13. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD and Mundy GR. 1986. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*, 319: 516-518.
14. Bickel M. 1993. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*, 64: 456-460.
15. Birkedal-Hansen H. 1993. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*, 64: 474-484.
16. Bragd L, Dahlen G, Wikstrom M and Slots J. 1987. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin Periodontol*, 14: 95-99.
17. Bramanti TE and Holt SC. 1991. Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50. *J Bacteriol*, 173: 7330-7339.
18. Bucher O und Wartenberg H. 1989. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 11. Aufl. Bern, Stuttgart, Toronto: Verlag Hans Huber, 372-373.
19. Buchmann R, Hasilik A, Nunn ME, Van Dyke TE and Lange DE. 2002. PMN responses in chronic periodontal disease: evaluation by gingival crevicular fluid enzymes and elastase- α -1-proteinase inhibitor complex. *J Clin Periodontol*, 29: 563-567.
20. Chantry D, Turner M, Abney E and Feldmann M. 1989. Modulation of cytokine production by transforming growth factor- β . *J Immunol*, 142: 4295-4300.
21. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC and Snyder B. 2000. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol*, 27: 897-903.
22. Cook GS, Costerton JW and Lamont RJ. 1998. Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *J Periodontal Res*, 33: 323-327.
23. Copulos TA, Low SB, Walker CB, Trebilcock YY and Hefti AF. 1993. Comparative analysis between a modified ultrasonic tip and hand instruments on clinical parameters of periodontal disease. *J Periodontol*, 64: 694-700.
24. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent RL Jr and Socransky SS. 2000. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol*, 27: 30-36.
25. Dalhoff A, Petersen U and Endermann R. 1996. In vitro activity of BAY 12-8039, a new 8-methoxyquinolone. *Chemotherapy*, 42: 410-425.

26. Deschner J. 2000. Zytokine und ihre Bedeutung für die parodontale Destruktion, Diagnostik und Therapie. ZMK, 6/01: 316-323.
27. Dinarello CA. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood, 77: 1627-1652.
28. Dinarello CA. 1994. Interleukin-1. In: Thomson A (Hrsg.). The cytokine handbook. 2. Aufl. San Diego: Academic Press Limited, 32-34.
29. Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z and Xie H. 1993. Interactions of Porphyromonas gingivalis with epithelial cells. Infect Immun, 61: 2260-2265.
30. Ebersole J. 1990. Systemic humoral immune responses in periodontal disease. Crit Rev Oral Biol Med, 1: 283-331.
31. Eick S and Pfister W. 2004. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. J Periodontol, 75: 1327-1334.
32. Eick S, Rödel J, Einax JW and Pfister W. 2002. Interaction of Porphyromonas gingivalis with KB cells: comparison of different clinical isolates. Oral Microbiol Immunol, 17: 201-208.
33. Elias JA, Gustilo K, Baeder W and Freundlich B. 1987. Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor. J Immunol, 138: 3812-3816.
34. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som A, Goodson JM and Socransky SS. 2002. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. J Clin Periodontol, 29: 724-735.
35. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP and Brisette C. 1999. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodontol, 20: 136-167.
36. Gamble JR and Vadas MA. 1991. Endothelial cell adhesiveness for human T-lymphocytes is inhibited by transforming growth factor- β 1. J Immunol, 146: 1149-1154.
37. Genco RJ. 1990. Classification and clinical radiographic features of periodontal disease. In: Genco RJ, Goldman HM and Cohen W (Hrsg.). Contemporary Periodontics. St Louis: CV Mosby, 63-81.
38. Genco RJ, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Ishikawa I, Listgarten M, Michalowicz B, Page R, Schenkein H, Slots J and Socransky SS. 1996. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol, 1: 926-932.
39. Goulbourne PA and Ellen RP. 1991. Evidence that Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis fimbriae function in adhesion to Actinomyces viscosus. J Bacteriol, 173: 5266-5274.

40. Graves DT and Cochran D. 2003. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74: 391-401.
41. Graves DT, Delima A, Assuma R, Amar S, Oates T and Cochran D. 1998. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol*, 69: 1419-1425.
42. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr and Socransky SS. 1997. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 24: 324-334.
43. Hamblin AS. 1993. In: Male D (Hrsg.). *Cytokines and cytokine receptors*. Oxford: Oxford University Press.
44. Hart T, Shapira L and Van Dyke TE. 1994. Neutrophil defects as risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*, 65: 521-529.
45. Hefti A. 2000. Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontol*, 3: 64-75.
46. Hellwig E, Klimek J and Attin T. 1999. Ätiologie entzündlicher Parodontopathien. In: Hellwig E, Klimek J and Attin T (Hrsg.). *Einführung in die Zahnerhaltung*. München, Jena: Urban und Fischer, 309-321.
47. Hirano T. 1991. Interleukin-6. In: *The cytokine handbook*. Thomson A (Hrsg.). 1. Aufl. New York: Academy Press, 169-190.
48. Huang GT, Haake SK and Park NH. 1998a. Gingival epithelial cells increase interleukin-8 secretion in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* challenge. *J Periodontol*, 69: 1105-1110.
49. Huang GT, Haake SK, Kim JW and Park NH. 1998b. Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. *Oral Microbiol Immunol*, 13: 301-309.
50. Hung HC and Douglass CW. 2002. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J Clin Periodontol*, 29: 975-986.
51. Jandinski J, Stashenko P, Feder LS, Leung CC, Peros WJ, Rynar JE and Deasy MJ. 1991. Localization of interleukin-1 beta in human periodontal tissue. *J Periodontol*, 62: 36-43.
52. Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K and Yamamoto K. 1994. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 269: 21371-21378.
53. Kelso A. 1990. Cytokines in infectious disease. *Aust Microbiol*, 11: 372-376.

54. Kikutani H, Taga T, Akira S, Kishi H, Miki Y, Saiki O, Yamamura Y and Kishimoto T. 1985. Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. *J Immunol*, 134: 990-995.
55. Klinger R. 1912. Untersuchungen über menschliche Aktinomykose. *Centralblatt Bacteriol*, 62: 191-200.
56. Kolenbrander PE. 1993. Coaggregation of human oral bacteria: potential role in the accretion of dental plaque. *J Appl Bacteriol*, 74: 79-86.
57. Kono Y, Beagley KW, Fujihashi K, McGhee JR, Taga T, Hirano T, Kishimoto T and Kiyono H. 1991. Cytokine regulation of localized inflammation. Induction of activated B cells and IL-6-mediated polyclonal IgG and IgA synthesis in inflamed human gingiva. *J Immunol*, 146: 1812-1821.
58. Kornman KS and Page RC. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *J Periodontol*, 14: 9-11.
59. Kurtis B, Develioglu H, Taner IL, Balos K and Tekin IO. 1999. IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. *J Oral Sci*, 41: 163-167.
60. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A and Olsen I. 2004. Changes in transforming growth factor- β 1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *J Clin Periodontol*, 31: 527-533.
61. Lamont RJ, Hersey SG and Rosan B. 1992a. Characterization of the adherence of *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* to oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol*, 7: 193-197.
62. Lamont RJ, Oda D, Persson RE, Persson GR. 1992b. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol*, 7: 364-367.
63. Lamont RL and Jenkinson HF. 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 1244-1263.
64. Lantz M. 1996. New insights into mechanisms of bacterial pathogenesis in periodontitis. *Curr Opin Periodontol*, 3: 10-18.
65. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS and Haffajee AD. 1984. Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Periodontol*, 11: 448-458.
66. Loos BG, Dyer DW, Whittam TS and Selander RK. 1993. Genetic structure of populations of *Porphyromonas gingivalis* associated with periodontitis and other oral infections. *Infect Immun*, 61: 204-212.

67. Lowik CWGM, Van der Pluijm G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OL and Aarden LA. 1989. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 162: 1546-1552.
68. MacGowan AP, Bowker KE, Holt HA, Wootton M and Reeves DS. 1997. Bay 12-8039, a new 8-methoxy-quinolone: comparative in-vitro activity with nine other antimicrobials against anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 40: 503-509.
69. Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A, Davis G, Chandler J, Zambon J and Genco RJ. 1999. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol*, 26: 374-380.
70. Madianos PN, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G and Sandros J. 1996. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithel cells in vitro. *Infect Immun*, 64: 660-664.
71. Martuscelli G, Fiorellini JP, Crohin CC and Howell TH. 2000. The effect of interleukin-11 on the progression of ligature-induced periodontal disease in the beagle dog. *J Periodontol*, 71: 573-578.
72. Meyer DH and Fives-Taylor PM. 1994. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun*, 62: 928-935.
73. Meyer DH and Fives-Taylor PM. 1997. The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontol disease. *Trends Microbiol*, 5: 224-228.
74. Meyer DH, Lippmann JE and Fives-Taylor PM. 1996. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun*, 64: 2988-2997.
75. Mikolajczyk-Pawlinska J, Kordula T, Pavloff N, Pemberton PA, Chen WC, Travis J and Potempa J. 1998. Genetic variation of *Porphyromonas gingivalis* genes encoding gingipains, cysteine proteinases with arginine or lysine specifity. *Biol Chem*, 379: 205-211.
76. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M and Kojima K. 1999. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol*, 44: 535-539.
77. Mombelli A, Schmid B, Rutar A and Lang NP. 2002. Local antibiotic therapy guided by microbiological diagnosis. *J Clin Periodontol*, 29: 743-749.
78. Moore WE and Moore LV. 1994. The bacteria of periodontal disease. *Periodontol*, 5: 66-77.

79. Murakami Y, Iwahashi H, Yasuda H, Umemoto T, Namikawa I, Kitano S and Hanazawa S. 1996. Porphyromonas gingivalis fimbriin is one of the fibronectin-binding proteins. Infect Immun, 64: 2571-2576.
80. Musso T, Espinoza-Delgado I, Pulkki K, Gusella GL, Longo DL and Varesio L. 1990. Transforming growth factor- β downregulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes. Blood, 76: 2466-2469.
81. Müller HP, Holderrieth S, Burkhardt U and Höffler U. 2002. In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of Actinobacillus actinomycetemcomitans to seven antibiotics. J Clin Periodontol, 29: 736-742.
82. Naruishi K, Takashiba S, Chou H, Arai H, Nishimura F and Murayama Y. 1999. Role of soluble interleukin-6 receptor in inflamed gingiva for binding of interleukin-6 to gingival fibroblasts. J Periodont Res, 34: 296-300.
83. Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N and Genco CA. 1997. A role for fimbriae in Porphyromonas gingivalis invasion of oral epithel cells. Infect Immun, 65: 1980-1984.
84. Oberdisse E. 2002. Pharmaka zur Behandlung und Prophylaxe von Infektionskrankheiten. In: Oberdisse E, Hackenthal E und Kuschinsky K (Hrsg.). Pharmakologie und Toxikologie. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 670-672.
85. Odake H, Koizumi F, Hatekeyama S, Furuta I and Nakagawa H. 1993. Production of cytokines belonging to the interleukin-8 family by human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 beta in culture. Exp Mol Pathol, 58: 14-24.
86. Ohsaki Y, Takahashi S, Scarcez T, Demulder A, Nishihara T and Williams R. 1992. Evidence of an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cell tumors of bone. Endocrinology, 131: 2229-2234.
87. Ojima M, Tamagawa H, Nagata H, Hanioka T and Shizukuishi S. 2000. Relation of motility of subgingival microflora as a clinical parameter to periodontal disease status in human subjects. J Clin Periodontol, 27: 405-410.
88. Okada H and Murakami S. 1998. Cytokine expression in periodontal health and disease. Crit Rev Oral Biol Med, 9: 248-266.
89. Overall CM, Wrana JL and Sodek J. 1991. Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF- β 1 and concanavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. J Periodontal Res, 26: 279-282.
90. Page RC. 1999. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. J Periodontal Res, 34: 331-339.
91. Page RC and Schroeder H. 1982. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel, New York: Karger.

92. Pascual A. 1995. Uptake and intracellular activity of antimicrobial agents in phagocytic cells. *Rev Med Microbiol*, 6: 228-235.
93. Pascual A, Garcia I, Ballesta S and Perea EJ. 1999. Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-cultured epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 12-15.
94. Pavloff N, Pemberton PA, Potempa J, Chen WC, Pike NR, Prochazka V, Kiefer MC, Travis J and Barr PJ. 1997. Molecular cloning and characterization of *Porphyromonas gingivalis* lysin-specific gingipain. A new member of an emerging family of pathogenic bacterial cysteine proteinases. *J Biol Chem*, 272: 1595-1600.
95. PEG. 1998. Einteilung der Fluorchinolone. *Chemotherapie Journal*, 7: 66-68.
96. Persson GR and Page RC. 1992. Diagnostic characteristics of crevicular fluid aspartate aminotransferase (AST) levels associated with periodontal disease activity. *J Clin Periodontol*, 19: 43-48.
97. Pihlstrom BL, Mc Hugh RB, Oliphant TH and Ortiz-Campos C. 1983. Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 1/2 years. *J Clin Periodontol*, 10: 524-541.
98. Potempa J, Pike R and Travis J. 1997. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (Gingipains) using peptidyl chloromethanes. *Biol Chem*, 378: 223-230.
99. Preiss D and Meyle J. 1994. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol*, 65: 423-428.
100. Rawlinson A, Dalati MHN, Rahman S, Walsh TF and Fairclough AL. 2000. Interleukin-1 and IL-1 receptor antagonist in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 27: 738-743.
101. Reißmann A. 2005. Der Einfluss von in Epithelzellen überlebenden *Porphyromonas gingivalis* auf Expression und Freisetzung proinflammatorischer Interleukine. Jena, Diplomarbeit Biologie.
102. Rosan B, Slots J, Lamont RJ, Listgarten MA and Nelson GM. 1988. Fimbriae of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and colonization of the mouth. *J Dent Res*, 67: 179.
103. Sandros J, Papapanou PN, Nannmark U and Dahlen G. 1994. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium in vitro. *J Periodont Res*, 29: 62-69.
104. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF and Papapanou PN. 2000. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res*, 79: 1808-1814.
105. Schifferle RE, Chen PB, Davern LB, Aguirre A, Genco RJ and Levine MJ. 1993. Modification of experimental *Porphyromonas gingivalis* murine infection by

- immunization with a polysaccharide-protein conjugate. *Oral Microbiol Immunol*, 8: 266-271.
106. Scott CF, Whitaker EJ, Hammond BF and Colman RW. 1993. Purification and characterization of a potent 70-kDa thiol lysyl-proteinase (Lys-gingivain) from *Porphyromonas gingivalis* that cleaves kininogenes and fibrinogen. *J Biol Chem*, 268: 7935-7942.
 107. Sfakianakis A, Barr CE and Kreutzer D. 2001. Mechanisms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced expression of interleukin-8 in gingival epithel cells. *J Periodontol*, 72: 1413-1419.
 108. Shalit I, Kletter Y, Halperin D, Waldman D, Vasserman E, Nagler A, Fabian I. 2001. Immunomodulatory effects of moxifloxacin in comparison to ciprofloxacin and G-CSF in a murine model of cyclophosphamide-induced leukopenia. *Eur J Haematol*, 66: 287-96.
 109. Sigusch B, Beier M, Klinger G, Pfister W and Glockmann E. 2001. A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol*, 72: 275-283.
 110. Singer RE and Buckner BA. 1981. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. *Infect Immun*, 32: 458-463.
 111. Sojar HT, Hamada N and Genco RJ. 1998. Structures involved in the interaction of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and human lactoferrin. *FEBS Lett*, 422: 205-208.
 112. Stahlmann R und Lode H. 2005. Antibiotika und Chemotherapeutika – antiinfektiöse Therapie. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F und Starke K (Hrsg.). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Aufl. München, Jena: Urban Fischer, 831-838.
 113. Stanley A, Wilson M and Newman HN. 1988. The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol*, 16: 259-264.
 114. Starnes HFJr. 1991. Biological effects and possible clinical applications of interleukin-1. *Semin Hematol*, 28: 34-41.
 115. Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA and Heeley JD. 1987. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res*, 2: 559-565.
 116. Steinsvoll S, Halstensen TS and Schenck K. 1999. Extensive expression of TGF- β 1 in cronicallly-inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol*, 26: 366-373.
 117. Sugai M, Kawamoto T, Peres SY, Ueno Y, Komatsuzawa H, Fujiwara T, Kurihara H, Suginaka H, Oswald E. 1998. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun*, 66: 5008-5019.

118. Svaton B, Sadxton CA, Huntington E and Cummins D. 1993. The effects of three silica dentrifices containing Triclosan on supragingival plaque and calculus formation and on gingivitis. *Int dent J*, 43: 441-452.
119. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S and Takada H. 1992. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun*, 60: 4932-4937.
120. Tatakis DN. 1993. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol*, 64: 416-431.
121. Teanpaisan R, Douglas CWI, Eley AR and Walsh TF. 1996. Clonality of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from periodontally diseased and healthy sites. *J Periodontal Res*, 31: 423-432.
122. The American Academy of Periodontology. 1996. Epidemiology of periodontal disease. *J Periodontol*, 67: 935-945.
123. Tracey K. 1994. Tumor necrosis factor-alpha. In: Thomson A (Hrsg.). *The Cytokine Handbook*. 2. Aufl. San Diego: Academic Press Limited, 291-292.
124. Turner M, Chantry D, Katsikis R, Berger A, Brennan FM and Feldmann M. 1991. Induction of the interleukin-1 receptor antagonist protein by transforming growth factor- β . *J Immunol*, 21: 1635-1639.
125. Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Takemoto T, Sakata M, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M and Kurihara H. 2001. Expression of IL-1 beta and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine*, 14: 152-161.
126. van der Pluijm G, Most W, van der Wee-Pals L, De Groot H, Papapoulos S and Lowic C. 1991. Two distinct effects of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on osteoclast development and subsequent resorption of mineralized matrix. *Endocrinology*, 129: 1596-1604.
127. van der Zee E, Everts V and Beertsen W. 1997. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol*, 24: 297-305.
128. Van Dyke TE, Lester MA and Shapira L. 1993. The role of the host response in periodontal disease progression: implications for future treatment strategies. *J Periodontol*, 64: 792-806.
129. van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goene RJ, Abbas F, Winkel EG and de Graaff J. 1989. Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol*, 16: 128-131.

130. Wakai K, Kawamura T, Umemura O, Hara Y and Machida JI. 1999. Association of medical status and physical fitness with periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 26: 664-672.
131. Weinberg A, Belton CM, Park Y and Lamont RJ. 1997. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 65: 313-316.
132. Weinberger BW. 1948. An introduction to the history of dentistry. St Louis: CV Mosby Co, 49-87; 205-207.
133. Wilson ME and Genco RJ. 1989. The role of antibody, complement and neutrophils in host defense against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Immunol Invest*, 18: 187-209.
134. Wingrove JA, Di Scipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J and Hugli TE. 1992. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-I) from *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis*. *J Biol Chem*, 267: 18902-18907.
135. Wolff L, Dahlen G and Aepli D. 1994. Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol*, 65: 498-510.
136. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD and Socransky SS. 2000. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, 27: 722-732.
137. Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T and Kato I. 1997. Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res*, 32: 279-286.
138. Zambon JJ, De Luca C, Slots J and Genco RJ. 1983b. Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell-line. *Infect Immun*, 40: 205-212.
139. Zambon JJ, Slots J and Genco RJ. 1983a. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun*, 41: 19-27.
140. Zhang J, Dong H, Kashket S and Duncan MJ. 1999. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb Pathog*, 26: 275-280.

9. Anhang

Tabelle 1 (zu Abb. 6) KBE freier *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der KB-Zellen mit den verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen nach 6 h und 18 h.

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>		<i>P. gingivalis</i>	
	6 h	18 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	548500	257500	1275000	63500
1/4 MHK	550500	212000	1155000	146500
2,5 µg/ml	510500	145000	1175000	103000
100 µg/ml	349500	1000	766000	54500

Tabelle 2 (zu Abb. 7) KBE freier *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der Bakterien mit den verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen nach 6 h und 18 h.

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>		<i>P. gingivalis</i>	
	6 h	18 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	480000	442500	703000	129000
1/4 MHK	418500	532500	269000	118500
2,5 µg/ml	337000	417000	88000	86500
100 µg/ml	302500	188000	224000	135000

Tabelle 3 (zu Abb. 8) KBE freier *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und der verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen zu den KB-Zellen nach 6 h und 18 h.

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>		<i>P. gingivalis</i>	
	6 h	18 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	1107000	432000	799000	150000
1/4 MHK	865000	7000	903000	10000
2,5 µg/ml	400000	1000	190000	800
100 µg/ml	57000	0	255000	700

Tabelle 4 (zu Abb. 9) KBE adhärenter *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der KB-Zellen mit den verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen nach 1 h, 6 h und 18 h.

	A. actinomycetemcomitans			P. gingivalis		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	102500	106500	126000	57350	97750	21450
1/4 MHK	96550	105900	150200	67100	101900	45700
2,5 µg/ml	80000	134500	132000	80700	118000	49500
100 µg/ml	104900	103450	1900	81400	86500	35700

Tabelle 5 (zu Abb. 10) KBE adhärenter *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der Bakterien mit den verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen nach 1 h, 6 h und 18 h.

	A. actinomycetemcomitans			P. gingivalis		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	51000	113000	140000	91000	105800	45800
1/4 MHK	43550	127000	137000	77700	75200	60100
2,5 µg/ml	48400	130500	157500	75000	73000	53400
100 µg/ml	52050	141500	169000	96400	100800	39700

Tabelle 6 (zu Abb. 11) KBE adhärenter *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und der verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen zu den KB-Zellen nach 1 h, 6 h und 18 h.

	A. actinomycetemcomitans			P. gingivalis		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	123000	131000	140050	42500	75500	53600
1/4 MHK	91600	88100	12650	42150	52350	7800
2,5 µg/ml	85000	58450	1550	36300	34350	100
100 µg/ml	98950	12800	100	23700	29550	550

Tabelle 7 (zu Abb. 12) KBE invasiver *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der KB-Zellen mit den verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen nach 1 h, 6 h und 18 h.

	A. actinomycetemcomitans			P. gingivalis		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	10015	15150	119700	13450	17000	1750
1/4 MHK	12400	17600	87600	15250	17000	1900
2,5 µg/ml	11650	11060	102350	17350	16650	1500
100 µg/ml	7285	14850	3050	14050	15650	250

Tabelle 8 (zu Abb. 13) KBE invasiver *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei Vorinkubation der Bakterien mit den verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen nach 1 h, 6 h und 18 h.

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>			<i>P. gingivalis</i>		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	61000	143500	121000	920	840	1150
1/4 MHK	53550	192500	119000	700	550	300
2,5 µg/ml	56100	191500	148000	690	520	280
100 µg/ml	38300	178000	174500	630	485	250

Tabelle 9 (zu Abb. 14) KBE invasiver *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 bei gleichzeitiger Zugabe der Bakterien und der verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen zu den KB-Zellen nach 1 h, 6 h und 18 h.

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>			<i>P. gingivalis</i>		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	13600	14050	215000	6150	13300	2100
1/4 MHK	11150	12150	15350	9490	11450	1000
2,5 µg/ml	9515	12600	1600	6120	5935	100
100 µg/ml	12500	8030	650	3655	4715	0

Tabelle 10 (zu Abb. 15) Freisetzung von IL-6 aus den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Zellen sowie aus den nicht infizierten Zellen in 18 h bei gleichzeitiger Zugabe von Bakterien und Moxifloxacin zu den KB-Zellen.

	Nicht infizierte Zellen			<i>A. actinomycetemcom.</i>			<i>P. gingivalis</i>		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	0	1,2	2,1	0	0,5	0,2	0	0,8	0,3
1/4 MHK	0	8	2,7	1	0	1,3	0,9	1,3	0
2,5 µg/ml	0	11	2,6	1,2	3	1,1	1,1	2	0
100 µg/ml	0	21	6,1	1,5	8	5,2	1,8	1,5	3,3

Tabelle 11 (zu Abb. 16) Freisetzung von IL-8 aus den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Zellen sowie aus den nicht infizierten Zellen in einem Zeitraum von 18 h bei Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin.

	Nicht infizierte Zellen			<i>A. actinomycetemcom.</i>			<i>P. gingivalis</i>		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	0,5	0	74	1,5	11,8	76	0	0	0
1/4 MHK	0,4	0,8	69	3,6	34,5	82	0	0	0
2,5 µg/ml	0,2	0,5	65	2,4	29	90	0	0	0
100 µg/ml	0,7	0	98	1,8	16,5	102	0	0	0

Tabelle 12 (zu Abb. 17) Freisetzung von IL-8 aus den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Zellen sowie aus den nicht infizierten Zellen in einem Zeitraum von 18 h bei Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin.

	Nicht infizierte Zellen			A. actinomycetemcom.			P. gingivalis		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	3,6	60	48,3	4,2	126	146	0	0	0
1/4 MHK				3,4	148	152	0	0	0
2,5 µg/ml				4,1	186	173	0	0	0
100 µg/ml				3,8	146	252	0	0	0

Tabelle 13 (zu Abb. 18) Freisetzung von IL-8 aus den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Zellen sowie aus den nicht infizierten Zellen in 18 h bei gleichzeitiger Zugabe von Bakterien und Moxifloxacin zu den KB-Zellen.

	Nicht infizierte Zellen			A. actinomycetemcom.			P. gingivalis		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	0,6	26	37	1,4	44	109	0	0	0
1/4 MHK	0,4	23	45	2,6	66	134	0	0	0
2,5 µg/ml	0,4	29	65	1,3	57	137	0	0	0
100 µg/ml	1,4	429	226	1,3	380	316	0	0	0

Tabelle 14 (zu Abb. 19) Freisetzung von TGF-β1 aus den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Zellen sowie aus den nicht infizierten Zellen in einem Zeitraum von 18 h bei Vorinkubation der KB-Zellen mit Moxifloxacin.

	Nicht infizierte Zellen			A. actinomycetemcom.			P. gingivalis		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	148	212	256	192	265	359	205	233	382
1/4 MHK	85	230	249	178	230	265	185	195	356
2,5 µg/ml	115	242	219	189	220	191	209	204	416
100 µg/ml	120	218	284	170	208	115	205	268	453

Tabelle 15 (zu Abb. 20) Freisetzung von TGF-β1 aus den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Zellen sowie aus den nicht infizierten Zellen in einem Zeitraum von 18 h bei Vorinkubation der Bakterien mit Moxifloxacin.

	Nicht infizierte Zellen			A. actinomycetemcom.			P. gingivalis		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	150	184	332	162	170	329	224	195	303
1/4 MHK				141	170	214	138	206	294
2,5 µg/ml				159	127	133	138	190	288
100 µg/ml				138	87,4	99,4	115	46	154

Tabelle 16 (zu Abb. 21) Freisetzung von TGF- β 1 aus den mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 inkubierten Zellen sowie aus den nicht infizierten Zellen in 18 h bei gleichzeitiger Zugabe von Bakterien und Moxifloxacin zu den KB-Zellen.

	Nicht infizierte Zellen			A. actinomycetemcom.			P. gingivalis		
	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h	1 h	6 h	18 h
ohne Antibiotikum	239	214	224	209	193	286	210	201	265
1/4 MHK	226	171	217	171	201	258	129	195	243
2,5 μ g/ml	217	122	201	132	142	195	120	150	233
100 μ g/ml	175	85	61	81	105	110	95	126	259

10. Danksagung

Frau PD Dr. med. habil. S. Eick und Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die gute, kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit. Besonderer Dank gilt dabei Fr. Dr. Eick für ihre ständige Ansprechbarkeit bei auftretenden Fragen und das zügige Korrigieren der einzelnen Abschnitte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube, dass ich als Doktorand die Einrichtungen seines Institutes nutzen durfte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena für ihre freundliche Unterstützung bei organisatorischen Belangen.

Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle für die Möglichkeiten, die sie mir in den letzten Jahren eröffnet haben und für ihre liebevolle Unterstützung bei der Verwirklichung all meiner Wünsche und Ziele, ganz herzlich danken.

11. Lebenslauf

Name: Stefanie Schwarz

Geburtsdatum: 21.04.1980

Geburtsort: Erfurt

Bisheriger Bildungsweg	1986-88	POS 17 in Erfurt
	1988-89	POS 31 in Erfurt
	1989-98	Kooperative Gesamtschule "Am Schwemmbach" in Erfurt

1998 Abitur

10/1998 – 03/2004	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
-------------------	---

13.01.2004 Approbation als Zahnärztin

01/2004 – 06/2004	Promotionsstudentin an der FSU Jena
-------------------	-------------------------------------

07/2004 – 06/2005	Vorbereitungsassistentin in der ZA-Praxis Dr. K. Heidrich-Öttl in Greifenberg/Ammersee
-------------------	--

seit 07/2005	Vorbereitungsassistentin in der ZA-Praxis Dipl. med. M. Schwarz in Erfurt
--------------	--

Jena, den

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. S. Eick, Prof. Dr. W. Pfister,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den